

Philipps



Universität
Marburg

Der Einfluss des dorsalen Hippocampus auf das instrumentelle Lernen und die Verhaltensflexibilität im Tiermodell der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Psychologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sebastian Busse

aus Leinefelde

Marburg (Lahn), Juli 2016

Vom Fachbereich Psychologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer Schwarting

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hauber

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Lernen und Gedächtnis.....	2
2.2. Instrumentelles Lernen.....	3
2.2.1. <i>Instrumentelle Konditionierung</i>	5
2.3. Die serielle Reaktionszeit-Aufgabe (serial reaction time task, SRTT)	7
2.3.1. <i>Versuchsaufbau des Ratten-SRTT</i>	8
2.3.2. <i>Training der Versuchstiere</i>	10
2.4. Hippocampus und Striatum	10
2.4.1. <i>Striatum</i>	10
2.4.2. <i>Hippocampus</i>	11
2.5 Die „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie.....	13
2.6 Das Phänomen der Leistungsverbesserung nach einer Hirnläsion.....	16
3. Fragestellung der Arbeit	17
4. Zusammenfassung der Publikationen.....	18
4.1. Studie 1: Prozedurale Leistungsverbesserungen nach exzitotoxischer Hippocampus-Läsion in der Ratten-Variante des seriellen Reaktionszeit-Test	18
4.2. Studie 2 und Studie 3: Entkopplung der Reaction-Outcome-Kontingenz: Läsionen des dorsalen Hippocampus führen zu instrumentellen Leistungsverbesserungen, beeinträchtigen jedoch die Verhaltensflexibilität von Ratten.....	21
5. Allgemeine Diskussion und Ausblick	26
5.1. Limitationen der Arbeit	27
5.2. Erklärungsansatz für die gefundenen Effekte	28
5.3. Ausblick	31
5.4. Fazit.....	33
6. Literaturverzeichnis	34
7. Appendix	45
Appendix I: Studie 1	45
Appendix II: Studie 2 und 3	60
Danksagung	76
Publikationen - Individuelle Leistungen.....	77
Eidesstattliche Erklärung	78

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Taxonomie der Gedächtnissysteme bei Säugetieren.....	2
Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Funktionsweise des Human-SRTT und typischer Ergebnisse bei pseudorandomisierter oder sequenzieller Stimulus-Präsentation.....	8
Abbildung 2:	Außen- und Innenansicht einer modifizierten Skinner-Box.....	9
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der räumlichen Position des Hippocampus im Gehirn der Ratte.....	14
Abbildung 4:	Modell der parallelen Gedächtnissysteme.....	15
Abbildung 5:	Modell des neuronalen Netzwerks von ausgewählten Verbindungen zwischen verschiedenen Hirnstrukturen, die Einfluss auf die Verhaltenskontrolle bei Nagetieren ausüben.....	30

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Genauigkeit (engl. <i>accuracy</i>)
DLS	Dorsolaterales Striatum
DMS	Dorsomediales Striatum
FI	Festes Intervall (engl. <i>fixed interval</i>)
FR	Feste Quote (engl. <i>fixed ratio</i>)
PPS	<i>Pokes</i> pro Sekunde (engl. <i>pokes per second</i>)
PRP	Nachverstärkungspause (engl. <i>postreinforcement pause</i>)
SRTT	Serielle Reaktionszeit-Aufgabe (engl. <i>serial reaction time task</i>)
S-R	Reiz-Reaktion (engl. <i>stimulus-response</i>)
R-O	Reaktion-Konsequenz (engl. <i>response-outcome</i>)
RT	Reaktionszeit (engl. <i>reaction time</i>)
VI	Variables Intervall (engl. <i>variable interval</i>)
VR	Variable Quote (engl. <i>variable ratio</i>)

1. Zusammenfassung

Schädigungen des Gehirns werden im Allgemeinen mit einer daraus resultierenden Einschränkung kognitiver Fähigkeiten in Verbindung gebracht. Diese Annahme wird zusätzlich von einer Vielzahl an empirischen Daten bestätigt, die mit Hilfe experimenteller Hirnläsionen erhoben werden konnten. Im Gegensatz zu funktionellen Defiziten ist der Befund einer Funktions- bzw. Leistungssteigerung nach einer Hirnläsion zwar seltener aufzufinden, stellt jedoch ein immer wieder auftretendes Phänomen in der neurowissenschaftlichen Forschung dar. Im Zusammenhang mit beobachteten Leistungsverbesserungen scheint vor allem der Hippocampus des Säugetiergehirns eine Sonderstellung einzunehmen. Hinweise darauf, dass eine Schädigung des Hippocampus in einer Leistungssteigerung der Probanden oder Versuchstiere resultiert, wenn diese Aufgaben mit spezifischen Verhaltensanforderungen bewältigen müssen, finden sich häufig in der Literatur wieder.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Hippocampus-Läsionen auf das prozedurale bzw. instrumentelle Lernen im Rattenmodell zu untersuchen. Hierzu wurde die Ratten-Version der sogenannten seriellen Reaktionszeit-Aufgabe (SRTT) verwendet, um das instrumentelle Lernen zu operationalisieren. Der Befund aus einer vorangegangenen Studie von Eckart et al. (2012) deutete darauf hin, dass Ratten mit der Läsion des dorsalen Hippocampus zwar Defizite des deklarativen Gedächtnisses aufweisen, jedoch im Paradigma des SRTT eine deutliche Verbesserung im instrumentellen Lernen zeigen.

In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verbesserung im instrumentellen Lernen der lädierten Ratten auch dann erhalten bleibt, wenn während der Trainingsphase des SRTT eine konstante Lernmenge für jedes Versuchstier eingehalten wird. Zusätzlich konnte ein Defizit im Extinktionslernen der Experimentalgruppe festgestellt werden.

In der zweiten Studie konnte gezeigt werden, dass Leistungssteigerungen in den lädierten Ratten auch mit der Verwendung einer pseudorandomisierten anstatt einer sich wiederholenden Stimulus-Präsentation im SRTT aufzufinden sind. Zusätzlich zeigte sich ein Defizit im Extinktionslernen der lädierten Ratten auch bei einer entwerteten Futterbelohnung. Weiterhin konnte eine deutliche Reduktion der nicht-aufgabenbezogenen Verhaltensweisen in der Experimentalgruppe über den Verlauf der Trainingsphase festgestellt werden.

In der dritten Studie konnte ein Defizit in der Verhaltensflexibilität der Versuchstiere nach einer Läsion des dorsalen Hippocampus festgestellt werden. Dazu wurden die Ratten nach Abschluss des SRTT-Trainings in einer R-O-entkoppelten Variante des SRTT getestet.

Die erhobenen Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die gefundenen Leistungsverbesserungen im SRTT nur ein Nebeneffekt komplexer Verhaltensveränderungen als Folge der Läsion des dorsalen Hippocampus sind. Ein spezifischer Erklärungsansatz dafür wird am Ende der Arbeit im Rahmen der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie diskutiert.

2. Einleitung

2.1. Lernen und Gedächtnis

Lernen beschreibt einen Prozess andauernder Veränderung und Anpassung basierend auf individuellen Erfahrungen. Dieser Prozess stellt eine intrinsische Eigenschaft aller Organismen dar und resultiert in individuellen Verhaltensmustern, sowie dem Erwerb von Kenntnissen und Fertigkeiten. Lernprozesse ermöglichen Organismen die Fähigkeit, sich verändernden Umweltbedingungen anzupassen und diese zu beeinflussen. Auf Grundlage dieses sehr breitbandigen und allgemeinen Begriffs *Lernen* lassen sich verschiedene Kategorien von Fähigkeiten und Vorgängen definieren. So können hiermit z.B. sowohl motorische Fertigkeiten, als auch die Verarbeitung von Sprache und Wissen beschrieben werden (Mazur 2014).

Zur genaueren Beschreibung von Lernvorgängen und deren Produkten ist es erforderlich, einen funktionellen Zusammenhang zum Nervensystem von Organismen herzustellen: Die Fähigkeit aufgenommene Informationen kodieren, speichern und wieder abrufen zu können wird konzeptionell als *Gedächtnis* bezeichnet. Die Ergebnisse aus Lernprozessen, sowie deren zugrundeliegenden Wahrnehmungen und Erfahrungen, werden in bestimmten neuronalen Arealen konsolidiert. Die gespeicherten Informationen können somit einem spezifischen *Gedächtnissystem* zugeordnet werden. Morris (2007) beschreibt eine Taxonomie der Gedächtnissysteme bei Säugetieren, die erstmals von Squire (1987) vorgestellt wurde, folgendermaßen:

Tabelle 1: Taxonomie der Gedächtnissysteme bei Säugetieren, nach Morris (2007)

Deklaratives Gedächtnis		Nichtdeklaratives Gedächtnis			
Episodisches Gedächtnis	Semantisches Gedächtnis	Prozedurales Gedächtnis	Priming	Klassische Konditionierung	Nichtassoziatives Lernen
Hippocampus/medialer Temporallappen		Striatum; motorischer Kortex; Cerebellum	Neokortex	Amygdala; Cerebellum	Reflexbögen

Lernen kann sowohl als bewusster, als auch als unbewusster Prozess ablaufen. Der Speicherort für bewusste Gedächtnisinhalte (Fakten, Sprache, Ereignisse) wird als deklaratives Gedächtnis bezeichnet, während unbewusste Gedächtnisinhalte (z.B. motorische Fähigkeiten und Reiz-Reaktions-Lernen) im nichtdeklarativen Gedächtnis gespeichert werden. Das deklarative Gedächtnis wird daher auch als explizites Gedächtnis, und das nichtdeklarative Gedächtnis als implizites Gedächtnis, bezeichnet (Mazur 2014).

Empirische Nachweise für diese Gliederung des Gedächtnisses konnten in einer Vielzahl von Humanstudien mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Paradigmen erbracht werden: Leistungen des deklarativen Gedächtnisses lassen sich klassischerweise mit simplen Aufgaben, wie dem Lernen von Wortlisten (Kinoshita 1995; Jacoby 1999), dem Wieder-

erkennen von Bildern (Rajaram 1996) oder der räumlichen Orientierung (Bohbot et al. 2002) untersuchen. Im Gegenzug lassen sich Leistungen des nichtdeklarativen Gedächtnisses mit Aufgaben untersuchen, welche z.B. motorische (*serial reaction time task*: Nissen und Bullemer 1987; Reber und Squire 1994) oder perzeptuelle/kognitive Fähigkeiten (*prototype/classification learning*: Squire und Knowlton 1995; *probabilistic classification learning*: Knowlton et al. 1996) erfordern. Des Weiteren resultieren Schädigungen spezifischer Hirnstrukturen nachweislich in selektiven Beeinträchtigungen der Gedächtnissysteme: Patienten, die nach einem Unfall Schädigungen des medialen Temporallappen aufweisen, zeigen zum Beispiel einen unterschiedlich starken Verlust deklarativer Gedächtnisfähigkeiten in Abhängigkeit des Ausmaßes der beschädigten Hirnareale (Scoville und Milner 1957; Stefanacci et al. 2000). Im Gegenzug weisen Parkinson-Patienten, aufgrund der im Krankheitsverlauf graduell zunehmenden Schädigung dopaminergischer Neurone der Substantia nigra, schlechtere Ergebnisse in der Bewältigung impliziter/prozeduraler Lernaufgaben auf (Lang und Lozano 1998a/b).

In Tierstudien finden sich analog zu Humanstudien ebenfalls Hinweise auf eine Gliederung des Gedächtnisses nach der Taxonomie von Squire: Experimente bei Ratten zeigten, dass die Versuchstiere nach selektiver Inaktivierung des Hippocampus oder des Striatum eine Präferenz für unterschiedliche Lernstrategien in Abhängigkeit des betroffenen Areals entwickelten. Eine Inaktivierung des Hippocampus ließ die Ratten vorrangig auf Basis von Reiz-Reaktions-Mustern lernen (nichtdeklaratives Gedächtnis) während die Versuchstiere nach einer Inaktivierung des Striatum bevorzugt räumlich-relationale Lernstrategien nutzten (deklaratives Gedächtnis; siehe Packard und McGaugh 1996). Die Ratten waren somit nicht mehr in der Lage eine mit einem spezifischen Gedächtnissystem assoziierte Lernstrategie zu verwenden, wenn die dafür zugrundeliegende neuronale Struktur beschädigt bzw. funktionell eingeschränkt wurde. Weiterhin zeigen eine Vielzahl an Läsions-, Mikroinfusions- und Verhaltensstudien, dass in Gedächtnissystemen eine parallele Informationsverarbeitungen stattfindet und sie in gegenseitiger Wechselwirkung miteinander stehen (Übersichtsartikel siehe White und McDonald 2002; Packard und Knowlton 2002; Gruber und McDonald 2012; White et al. 2013; Cameron und Glover 2015).

2.2. Instrumentelles Lernen

Als Unterform des allgemeinen Lernbegriffs und als Teil des prozeduralen Gedächtnisses lässt sich das *instrumentelle Lernen* definieren. Dieser Begriff beschreibt eine besondere Form des Lernens, welche das Erlernen von Reiz-Reaktions-Mustern (*Stimulus-Response*) betrifft. Anfänglich spontanes Verhalten kann mit dem Einsatz von Verstärkern (z.B. Belohnungen) oder Bestrafungen in der Häufigkeit des Auftretens beeinflusst werden. Dieser Vorgang wird als *instrumentelle Konditionierung* bezeichnet. So lässt sich z.B. die Geschwindigkeit und Häufigkeit, mit der eine Ratte auf einen Licht- oder Tonreiz (*Stimulus*) reagiert, er-

höhen, wenn nach einer korrekten Antwort (Reaktion, engl. *response*) eine Futter- oder Wasserbelohnung als Verstärker (Konsequenz, engl. *outcome*) eingesetzt wird. Im Gegenzug lässt sich das gleiche Verhalten in seiner Auftrittshäufigkeit verringern, wenn auf eine Antwort der Ratte z.B. ein elektrischer Fußschock als Bestrafung folgt. Das Formen des ursprünglich spontanen Verhaltens hin zu Reiz-Reaktions-Antworten wird als *Shaping* bezeichnet (Mazur 2014).

Das Hauptunterscheidungsmerkmal der instrumentellen Konditionierung gegenüber der klassischen Konditionierung ist, dass der lernende Organismus bei der klassischen Konditionierung weder Kontrolle über den Reiz, noch über seine Reaktion hat. Im Gegensatz dazu wird bei der instrumentellen Konditionierung ein ursprünglich spontanes Verhalten, in Abhängigkeit der folgenden Konsequenz, immer deutlicher zielgerichtet ausgeprägt (Gluck et al. 2014). Für das instrumentelle Lernen spielt also nicht nur die Stimulus-Response-Assoziation (S-R) eine Rolle, sondern auch die Response-Outcome-Assoziation (R-O). Dass es sich hierbei um zwei verschiedene Bestandteile des instrumentellen Lernens handelt, konnte in verschiedenen Outcome-Devaluation-Studien gezeigt werden. In diesen Experimenten werden Versuchstiere mit zwei gleichwertigen Futterverstärkern für korrekte Reaktionen belohnt. Nach erfolgreicher Konditionierung wird einer der beiden Verstärker devaluiert (d.h. entwertet), indem z.B. das Versuchstier zuvor mit einem der beiden Verstärker gesättigt wird oder indem dem zu devaluierenden Verstärker eine geringe Menge Lithium beigegeben wird. Letzteres hat eine Nahrungsaversion zur Folge. In anschließenden Tests ist die Antwortfrequenz auf den devaluierten Verstärker deutlich reduziert. Hieraus folgt, dass Versuchstiere ihre Reaktion zielgerichtet auf den Verstärker konzentrieren, der für sie das bessere Resultat zur Folge hat bzw. dem sie mehr „Wert beimessen“ (Colwill und Rescorla 1985). Die R-O-Assoziation hat somit unabhängig von der S-R-Assoziation Einfluss auf das ausgeführte Verhalten.

Dickinson et al. (1995) schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen mehrerer Outcome-Devaluation-Tests, dass S-R- und R-O-Assoziationen unterschiedliche Aufgaben während des instrumentellen Lernverlaufs übernehmen. Während R-O-Assoziationen vor allem während der Akquisitionsphase von instrumentellen Gedächtnisinhalten den Lernvorgang dominieren, so kommt es bei andauerndem Training zu einer graduellen Übertragung der Verhaltenskontrolle auf S-R-Assoziationen. Als Abgrenzung zum ergebnisorientierten bzw. zielgerichteten Lernen werden Lernvorgänge, die auf S-R-Assoziationen beruhen, als *habit learning* (deutsch „Gewohnheitslernen“) bezeichnet. Die beiden Prozesse des zielgerichteten Lernens und des *habit learnings* unterscheiden sich vor allem in ihrer Sensitivität gegenüber einer Devaluation des eingesetzten Verstärkers. R-O-Assoziationen sind sehr anfällig gegenüber einer Devaluation des Verstärkers, während S-R-Assoziationen durch eine geringe

Sensitivität gegenüber einer Devaluation des Verstärkers geprägt sind (Dickinson et al. 1995; Gruber und McDonald 2012).

2.2.1. Instrumentelle Konditionierung

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche instrumentelle Konditionierung stellen *Kontiguität* und *Kontingenz* dar. So ist die Effektivität eines Verstärkers besonders hoch, wenn dieser unmittelbar nach der Reaktion erfolgt (zeitliche Kontiguität). Je größer der zeitliche Abstand zwischen Reaktion und Verstärker, desto geringer ist der instrumentelle Lernerfolg aufgrund der schwächeren Assoziation zwischen Reiz, Reaktion und Konsequenz (Stimulus-Response-Outcome; S-R-O). Neben der zeitlichen Kontiguität spielt die Kontingenz zwischen Reaktion und Konsequenz eine wichtige Rolle: Kontingenz beschreibt die Kausalbeziehung zwischen zwei oder mehreren Ereignissen. Nur wenn Reaktion und Konsequenz in Verbindung miteinander und in der korrekten Reihenfolge auftreten ($R \rightarrow O$) kann eine Assoziation hergestellt werden. Kontingenz kann jedoch nicht nur zwischen Reaktion und Konsequenz etabliert werden. Der Kontext, in welchem die S-R-O-Assoziation auftritt, kann einen entscheidenden Einfluss auf das erlernte Verhalten haben. So kann ein diskriminativer Hinweisreiz (z.B. ein zusätzlicher Licht- oder Tonreiz) signalisieren, ob eine bestimmte Konsequenz (Belohnung oder Bestrafung) zu erwarten ist.

Nach dem erfolgreichen Shaping eines Verhaltens kann mit Hilfe sogenannter Verstärkerpläne das gewünschte Verhalten in seiner Auftretenswahrscheinlichkeit maximiert werden (Mazur 2014). Eine Verstärkung muss dabei nicht nur nach jeder korrekten Reaktion erfolgen (kontinuierliche Verstärkung), sondern kann, je nach Verstärkerplan, auch nach einem bestimmten zeitlichen Intervall oder einer bestimmten Menge an korrekten Reaktionen erfolgen. Ferster und Skinner (1957) definierten hierfür zwei Kategorien von Verstärkerplänen, welche sich wiederum in jeweils zwei Varianten einteilen lassen. 1. Quotenpläne: Eine Verstärkung erfolgt in einem Quotenplan entweder nach einer festen (fester Quotenplan, engl. *fixed ratio*, FR) oder variablen (variabler Quotenplan, engl. *variable ratio*, VR) Menge an gewünschten Reaktionen. Als Beispiel für einen festen Quotenplan (FR) dient das in dieser Arbeit verwendete Paradigma der seriellen Reaktionszeit-Aufgabe. Eine Ratte lernt hierzu das Einstecken der Schnauze in beleuchtete Öffnungen (engl. *nose poke*) und bekommt für 13 korrekte Reaktionen eine Futterbelohnung (FR-13). Ein variabler Quotenplan (VR) würde für das gleiche Experiment bedeuten, dass eine Ratte im statistischen Mittel nach 13 korrekten Reaktionen eine Futterbelohnung bekommt (VR-13). Im Einzelfall kann die Belohnung jedoch bereits nach z.B. 9 oder erst nach 15 korrekten Reaktionen erfolgen. 2. Intervallpläne: Bei Intervallplänen kann eine Verstärkung nach einem festen (fester Intervallplan, engl. *fixed interval*, FI) oder variablen (variabler Intervallplan, engl. *variable interval*, VI) Zeitintervall erfolgen. Im Gegensatz zum FR-Quotenplan wird das gewünschte Verhalten einer Ratte im FI-Quotenplan nicht nach einer festen Menge an korrekten Reaktionen verstärkt, sondern nach

dem Ablauf einer zeitlichen Periode bis zu einer korrekten Reaktion (z.B. 30 Sekunden-Intervall, siehe Experiment 2, Studie 2). Im Vergleich dazu erfolgt eine Verstärkung in einem variablen Intervallplan (VI) im statistischen Mittel nach einer z.B. 30 Sekunden langen Periode. Im Einzelfall kann eine Verstärkung jedoch bereits zeitlich früher oder später erfolgen.

Ein Phänomen, welches sich vor allem bei der Verwendung von FR-Verstärkerplänen beobachten lässt, ist die Nachverstärkungspause (engl. *postreinforcement pause*, PRP). Instrumentelles Lernen unter Verwendung eines FR-Verstärkerplans resultiert im Vergleich zu anderen Verstärkerplänen in relativ langen Nachverstärkungspausen, da hier das trainierte Verhalten einer Reaktionskette gleicht: Antworten zu Beginn einer Reaktionskette sind immer am schwächsten, denn unmittelbar nach einer Verstärkung befindet sich das Versuchstier am weitesten von der als nächstes folgenden Verstärkung entfernt (Mazur 2014). Andere Erklärungen für das Vorkommen von Nachverstärkungspausen, wie Ermüdung nach einer Vielzahl an Reaktionen oder eine Unterbrechung aufgrund von Sättigung direkt nach der Verstärkung, konnten in Experimenten mit verschiedenen, aufeinanderfolgenden FR-Verstärkerplänen als Erklärung für das Phänomen der langen Nachverstärkungspausen ausgeschlossen werden (Mintz et al. 1967; Crossman 1968).

Wiederholtes Präsentieren eines Stimulus ohne Verstärkung nach einer korrekten Antwort führt zu einer graduellen Verringerung der Reaktionsfrequenz und schließlich zum vollständigen Ausbleiben der Reaktion. Dieser Vorgang wird als *Extinktion* bezeichnet. Hierbei kommt es zur Auslöschung von zuvor erlernten S-R-O-Assoziationen als Folge der ausbleibenden Verstärkung. Die Extinktion einer erlernten Assoziation ist jedoch kein „Umkehren“ des vorangegangenen Lernprozesses. Iwan Pawlow stellte bereits während seiner berühmten Verhaltensexperimente zur klassischen Konditionierung fest, dass eine zuvor erfolgreich ausgelöschte Assoziation bei einer erneuten Präsentation des Stimulus spontan wieder auftreten konnte (Spontanerholung, engl. *spontaneous recovery*). Stattdessen wird durch das Erlernen einer neuen Assoziation die vorherige Assoziation vorübergehend und kontextabhängig inhibiert. Der vorübergehende Aspekt dieser Inhibition konnte durch das Auftreten der sogenannten Erneuerung (engl. *rapid reacquisition*), und der kontextabhängige Aspekt durch die sogenannte Wiederinkraftsetzung (engl. *disinhibition*), nachgewiesen werden (Mazur 2014).

Unterschiede zwischen den vier Hauptkategorien von Verstärkerplänen bestehen in Frequenz und Stabilität der Antwortreaktionen, der Dauer der Nachverstärkungspause und der Resistenz gegenüber einer Extinktion von erfolgreich hergestellten S-R-O-Assoziationen (Gluck et al. 2014). In den Experimenten dieser Arbeit kamen FR-Verstärkerpläne zum Einsatz. Diese resultieren in einer hohen und stabilen Frequenz der Antworten und langen Nachverstärkungspausen. Die Länge der PRP ist abhängig von der Höhe der erforderlichen

Reaktionen, die der Quotenplan vorgibt. Weiterhin zeigen FR-Verstärkerpläne eine moderate Resistenz gegenüber einer Extinktion (Mazur 2014).

2.3. Die serielle Reaktionszeit-Aufgabe (*serial reaction time task, SRTT*)

Ein etabliertes Paradigma zur Analyse und Erforschung des prozeduralen Gedächtnisses und dessen neuronaler Grundlagen ist die sogenannte serielle Reaktionszeit-Aufgabe. Mit dieser Methode konnten die Autoren Nissen und Bullemer in einer Studie aus dem Jahr 1987 zeigen, dass gesunde Probanden deutlich schneller auf visuell dargebotene Stimuli via Tastendruck reagierten, wenn deren Präsentation in einer sich wiederholenden Sequenz erfolgte. Im Gegenzug zeigten die Probanden längere Reaktionszeiten, wenn die Reizdarbietung zufällig erfolgte. Eine Darstellung des Versuchsablaufs befindet sich in Abbildung 1.

Den untersuchten Probanden war weder bekannt ob es sich um sich wiederholende oder zufällige Sequenzen handelte, noch konnten die Probanden in nachfolgenden Tests die Abfolge der zuvor präsentierten Sequenz bewusst abrufen und wiedergeben. Dies deutete darauf hin, dass es sich hier um einen unbewussten und somit impliziten Lernprozess handelte (Nissen und Bullemer 1987; Cohen et al. 1990). Studien an Probanden mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen oder Hirnschädigungen konnten mit Hilfe des SRTT weitere Befunde dafür liefern, dass implizite und explizite Lernprozesse von verschiedenen Hirnarealen vermittelt werden. So zeigen Amnesie-Patienten mit Schädigungen des medialen Temporallappens vergleichbare Lernleistungen im SRTT wie gesunde Versuchspersonen, weisen jedoch Defizite in deklarativen bzw. expliziten Gedächtnisleistungen auf (Hopkins et al. 2004; Nagy et al. 2007). Umgekehrt zeigten Patienten mit Dysfunktionen der Basalganglien, wie z.B. Morbus Parkinson, deutliche Defizite im SRTT, was auf Beeinträchtigungen des impliziten Lernens hindeutete (Wilkinson et al. 2009).

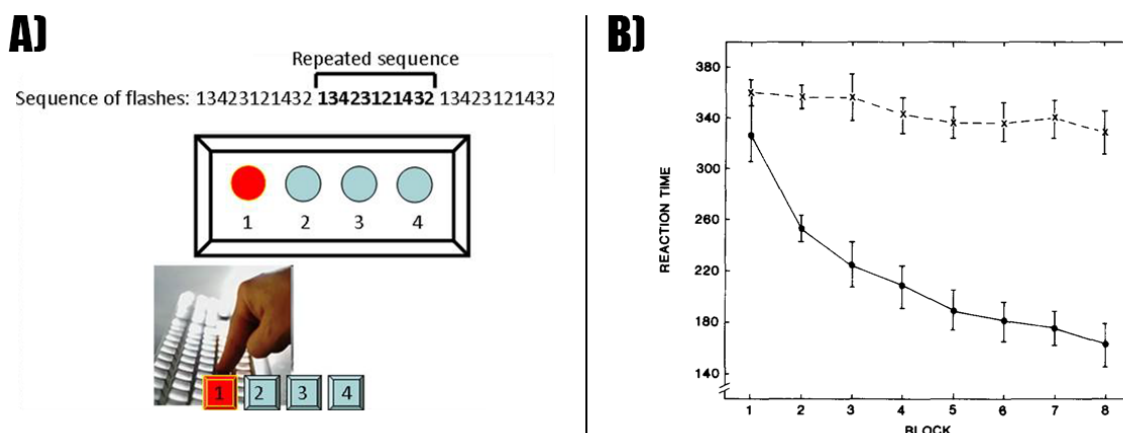


Abbildung 1: **A)** Schematische Darstellung der Funktionsweise des Human-SRTT. **B)** Verlauf der Reaktionszeiten bei sequentieller (durchgehende Linie) und randomisierter (gestrichelte Linie) Reizdarbietung (nach Nissen und Bullemer 1987).

Basierend auf den Erkenntnissen vorangegangener Humanstudien wurde das Paradigma des SRTT im Jahr 2005 von Domenger und Schwarting auf das Tiermodell der Ratte übertragen. Im Verlauf von drei weiteren Studien konnte ein solches standardisiertes, tierexperimentelles Modell mit hoher Augenscheinvalidität zum Human-SRTT etabliert werden (Domenger und Schwarting 2006, 2007, 2008), welches auch die methodische Grundlage für die vorliegende Arbeit darstellt.

Der Übergang auf ein Tiermodell ermöglicht es, ethische und methodische Limitationen von Humanstudien zu überwinden und die Aussagekraft experimenteller Untersuchungen mit Hilfe spezifischer Manipulationsansätze zu erhöhen. So können durch standardisierte Labor- und Experimentalbedingungen empirische Daten mit hoher Reliabilität generiert werden. Gleichzeitig lassen sich durch gezielte Manipulationen an neuronalen Arealen (z.B. neurotoxisch oder pharmakologisch) Fragestellungen untersuchen, die in Studien mit menschlichen Probanden nicht oder nur mit unzureichender Reliabilität und Validität umsetzbar wären. Als weiteren Vorteil bietet der Ratten-SRTT die Einsetzbarkeit in etablierten und validierten Nager-Modellen für psychische und neurologische Erkrankungen, die im Zusammenhang mit sequenziellem bzw. instrumentellem Lernen im Humanbereich stehen. Als Beispiele finden sich hier Schizophrenie- (Schwabe et al. 2006; Peleg-Raibstein et al. 2009) und Amnesie-Modelle (de Hoz et al. 2003, 2004), sowie Nager-Modelle zur Parkinson-Krankheit (Berger et al. 1991; Fornaguera et al. 1994; Fornaguera und Schwarting 1999; Blandini et al. 2007; Da Cunha et al. 2009).

2.3.1. Versuchsaufbau des Ratten-SRTT

Die Funktionsweise des verwendeten Ratten-SRTT wird detailliert in Publikation 1 beschrieben (siehe auch Domenger und Schwarting 2008, Eckart et al. 2012), daher folgt an dieser Stelle lediglich eine verkürzte Beschreibung des Versuchsaufbaus. Grundlage des Paradigmas bilden vier modifizierte Skinner-Boxen, in denen sich an einer der Innenwandseiten eine Aushöhlung befindet. In dieser befindet sich wiederum mittig platziert eine Futterraufe. Zusätzlich sind vier kleine Öffnungen (sogenannte *nose poke holes*) halbmondförmig um diese Futterraufe angebracht. Diese Öffnungen sind mit LEDs und Lichtschranken ausgestattet und folgendermaßen angeordnet: oben links [1], oben rechts [2], unten links [3], unten rechts [4] (Abbildung 2). Ist eine der Öffnungen aktiv, so wird dies mit einem anhaltenden Leuchten der LED angezeigt. Sobald eine Ratte ihre Schnauze in die illuminierte Öffnung steckt, wird dies durch die Lichtschranke als korrekte Reaktion (*poke*) registriert, das Leuchten dort beendet und sofort eine der anderen Öffnungen beleuchtet. Die Anordnung der *nose poke holes* ist so gewählt, dass die Öffnungen einfach zu erreichen sind und die Abstände zwischen den Öffnungen nur geringe Unterschiede aufweisen. Des Weiteren werden durch diese Anordnung die Anforderungen an das räumliche bzw. deklarative Gedächtnis so gering wie möglich gehalten. Die Futterraufe ist mit einem Futterspender verbunden, welcher durch das

Absolvieren einer vorher festgelegten Anzahl an korrekten *pokes* aktiviert wird. Die Sequenz, in der die vier Öffnungen nacheinander beleuchtet werden, besteht aus 12 Items und kann entweder pseudorandomisiert (d.h. die Reihenfolge der Beleuchtung ist zufällig, aber eine Öffnung ist niemals zweimal direkt nacheinander beleuchtet) oder in einer sich wiederholenden Reihenfolge zweiter Ordnung (3-2-4-1-3-4-2-1-2-3-1-4) ablaufen. Das Erlernen von Sequenzen zweiter Ordnung ist im Vergleich zum Erlernen Sequenzen erster Ordnung erschwert, da immer mindestens zwei aufeinanderfolgende Positionen bekannt sein müssen, um die darauf folgende Position vorhersehen zu können (Reed und Johnson 1994). Sequenzen zweiter Ordnung finden Verwendung in Studien mit der Humanvariante des SRTT (z.B. bei Legasthenie/Dyslexie: Deroost et al. 2010) und kommen daher ebenfalls analog im Ratten-SRTT zum Einsatz.

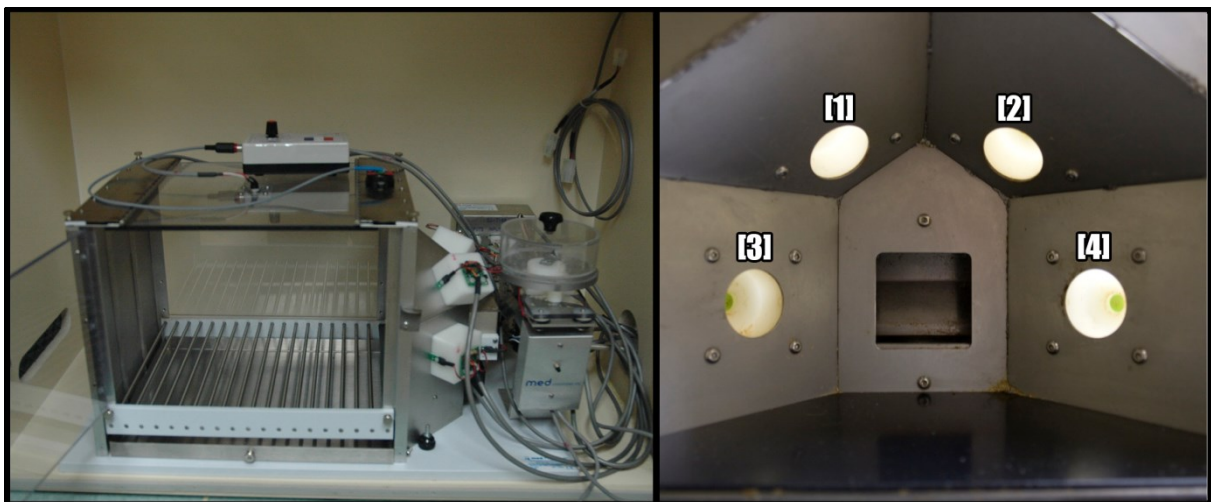


Abbildung 2: Außen- und Innenansicht einer modifizierten Skinner-Box, die für das Paradigma der seriellen Reaktionszeit-Aufgabe (SRTT) verwendet wurde (Foto von Sara Förster).

Als wichtigster Unterschied zur Humanvariante des SRTT ist zu erwähnen, dass Ratten während der Tests für korrekte Reaktionen belohnt (d.h. instrumentell konditioniert) werden müssen, um die SRTT-Aufgabe zu erlernen. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde ein FR-13-Verstärkerplan verwendet, wodurch die Ratten nach 13 korrekten *pokes* mit Futterpillen über den Futterspender belohnt wurden. Die Kombination aus einer aus 12 Items bestehenden Sequenz und eines FR-13-Verstärkerplans verhinderte die Assoziation einer bestimmten Öffnung in der Skinner-Box mit der Belohnung: Die beleuchtete Öffnung, welche für das Auswerfen der Futterbelohnung zuständig war, wanderte nach jeder erfolgreichen Sequenz um eine räumliche Position weiter. Weiterhin wurde die Futterbelohnung immer an einer anderen Stelle der Sequenz eingeworfen, was ebenfalls eine Assoziation von Sequenz-Position und Futterbelohnung verhinderte.

2.3.2. Training der Versuchstiere

Der Versuchsablauf teilte sich in eine Anlern- und eine Testphase ein. Die Anlernphase teilte sich wiederum in eine Shaping-Phase und eine Trainingsphase auf. Während der Shaping-Phase wurden alle Versuchstiere täglich für jeweils 20 Minuten trainiert und graduell an das FR-13-Kriterium herangeführt (siehe Material und Methoden in Publikation 1). In dieser Phase wurden Fehler oder ausbleibenden Reaktionen (Zeitlimit: 5 Sekunden) mit einem milden, aversiven Reiz (Licht und Ton) bestraft. Nach einer Bestrafung wurde die Sequenz an der unterbrochenen Position fortgesetzt. Nachdem eine Ratte die erforderliche Zahl an korrekten Reaktionen durchgeführt hatte, wurde eine entsprechende Menge an Futterpillen in die Futterraufe eingeworfen. Das Versuchstier hatte dann die Möglichkeit das Futter innerhalb eines Zeitlimits von 60 Sekunden zu fressen. Wenn die Ratte bis zum Ablauf des Zeitlimits keinen weiteren *nose poke* zeigte, wurde der Strafreiz präsentiert und die nächste FR-13-Sequenz begann automatisch. Das Versuchstier konnte jedoch auch innerhalb des 60-sekündigen Zeitlimits eigenmächtig, durch eine korrekte Reaktion, die nächste FR-13-Sequenz beginnen. Der Zeitraum zwischen Einwurf der Futterbelohnung und dem Beginn der nächsten Sequenz stellte die *postreinforcement pause* (PRP) dar und wurde neben der Reaktionszeit (*reaction time*, RT, in s) und der Genauigkeit (Anzahl korrekter Reaktionen im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Reaktionen, *accuracy*, ACC) als Testvariable aufgezeichnet.

Nach Abschluss der Shaping-Phase wurden alle Versuchstiere täglich auf Basis des FR-13-Kriteriums trainiert. Im Gegensatz zur vorangegangenen Phase wurden die Ratten nun jedoch nicht mehr für 20 Minuten pro Tag trainiert, sondern mussten eine feste Anzahl von 20 vollständigen FR-13-Sequenzen absolvieren. Dieser Wechsel des Trainingsprogramms garantierte eine gleichmäßige Verteilung der Lernmenge für jedes Versuchstier und ermöglichte es, für individuelle Unterschiede im Lernverlauf der Ratten zu kontrollieren. Zusätzlich ergab sich dadurch eine weitere Testvariable, da jetzt jedes Versuchstier die Aufgabe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit absolvieren konnte und diese wurde als Versuchszeit (*session time*) aufgezeichnet.

2.4. Hippocampus und Striatum

2.4.1. Striatum

Das Striatum, ein Bestandteil der Basalganglien, ist für das Lernen und Kodieren von S-R-Assoziationen von großer Bedeutung (Graybiel 1998). In Experimenten mit neurotoxischen Läsionen von Teilen des Striatum konnte gezeigt werden, dass eine Schädigung dieses neuronalen Areals zu einer deutlich verschlechterten Leistung in Tests führt, die eine hohe instrumentelle bzw. sequenzielle Komponente aufweisen (siehe z.B. Domenger und Schwarting 2008; Eckart et al. 2010). Während die Verarbeitung motorischer Funktionen dem dorso-lateralen Teil des Striatum zugeschrieben wird, lassen sich noch zwei weitere, anatomisch und funktionell getrennte, Bereiche des Striatum definieren: Der dorsomediale Teil des Stria-

tum spielt eine wichtige Rolle für die Verhaltensflexibilität und das zielgerichtete Verhalten (R-O-Assoziationen; siehe Braun und Hauber 2011, 2012), während der ventrale Bereich des Striatum Funktionen für die Integration von emotionalen und motivationalen Informationen (z.B. Bewertung von Belohnungen) übernimmt und somit eine Steuerung des motivierten Verhaltens ermöglicht (Mogenson et al. 1980).

In eine Reihe von Läsionsstudien konnte gezeigt werden, dass vor allem das dorsolaterale (DLS) und dorsomediale Striatum (DMS) eine entscheidende Rolle für das Lernen von S-R-O-Assoziationen spielen: Ratten mit einer Läsion des DLS zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Devaluation des eingesetzten Verstärkers, während Ratten mit einer Läsion des DMS keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu einer schein-lädierten Versuchsgruppe aufwiesen. Eine Schädigung des DLS verhinderte somit die Übertragung der Verhaltenskontrolle von R-O- auf S-R-Lernprozesse und damit die Bildung eines *habits* (Yin et al. 2004). In einer folgenden Studie konnten Yin et al. (2005) zeigen, dass spezifischere Läsionen bzw. temporäre Inaktivierungen des posterioren DMS die Sensitivität gegenüber einer Verstärkerdevaluation verringerten und die lädierten Ratten für eine Verschlechterung der Kontingenz zwischen Reaktion und Verstärker weniger anfällig waren. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Befunden, dass eine Schädigung des DMS die initiale Akquisition von R-O-Assoziationen, sowie das Ausführen von instrumentellen, zielgerichteten Verhaltensweisen, verhinderte und die getesteten Versuchstiere daher auf das Lernen von S-R-Assoziationen (*habit learning*) beschränkt waren. Dieses funktionelle Defizit von instrumentellen Lernvorgängen muss jedoch klar von Beeinträchtigungen des Motivationssystems und der Fähigkeit der Versuchstiere zur Bewertung der Wertigkeit eines Verstärkers getrennt werden. Zwar resultierten Läsionen des Nucleus accumbens (Bestandteil des ventralen Striatum) in einer verringerten Sensitivität gegenüber einer Verstärkerdevaluation, jedoch fand sich hier kein Effekt auf die Sensitivität gegenüber einer Verschlechterung der Kontingenz (Corbit et al. 2001), was somit auf eine Beeinflussung des Motivationssystems hinwies. Im Gegenzug resultierten Läsionen der basolateralen Amygdala in einer beeinträchtigten Fähigkeit zur Diskriminierung von unterschiedlich wertigen Verstärkern (Blundell et al. 2001; Balleine et al. 2003).

2.4.2. Hippocampus

Die Funktionen des Hippocampus sind bis heute nicht vollständig geklärt und verschiedene Interpretationsansätze finden sich hierzu in der Literatur (Morris 2007). Weitgehende Übereinstimmung besteht jedoch in zwei vorherrschenden Theorien: Die Rolle des Hippocampus für das deklarative Gedächtnis, also die Speicherung von Fakten und Ereignissen, die bewusst abgerufen werden können, wird durch eine Vielzahl von Befunden aus Humanstudien mit Patienten, bei denen eine Schädigung des Hippocampus vorliegt, gestützt (Tulving 1984; Squire 1992). Da das Abrufen bewusster Gedächtnisinhalte in Studien mit Versuchstieren

nicht direkt getestet werden kann, kommen hier Modelle des deklarativen Gedächtnisses zum Einsatz, welche eine ähnliche Funktion analog zu Humanstudien abbilden. Bei der Untersuchung von Affen oder Nagetieren werden daher z.B. sogenannte Objekt-Wiedererkennungstests verwendet, mit denen eine Messung der Leistungsfähigkeit des episodischen Gedächtnisses ermöglicht wird (Ennaceur et al. 1997; Clayton und Dickinson 1998).

Eine Variante dieses Paradigmas zur Messung der deklarativen Gedächtnisleistung ist der sogenannte Objekt-Ort-Wiedererkennungstest (engl. *Object-Place Recognition Test*). In diesem Test wird ein Versuchstier in ein Offenfeld mit zwei identischen Objekten gesetzt. Über den Verlauf eines festgelegten Zeitintervalls wird das Versuchstier nun in seinem Explorationsverhalten beobachtet. Nach Ablauf des Zeitintervalls wird das Versuchstier aus dem Offenfeld entfernt und eines der beiden Objekte räumlich verschoben. Nach einer kurzen Pause wird das Versuchstier wieder zurück in das Offenfeld gesetzt und erneut das Explorationsverhalten beobachtet. Während unbehandelte Versuchstiere im zweiten Durchlauf eine klare Präferenz für das räumlich verschobene Objekt zeigen, findet man bei Versuchstieren mit Schädigungen des Hippocampus eine gleichhäufige Exploration beider Objekte (Bevins und Besheer 2006; Eckart et al. 2012).

Zusätzlich konnte auf Basis von elektrophysiologischen Zellableitungen an Nagetieren gezeigt werden, dass der Hippocampus durch die Ausbildung von räumlichen Karten (engl. *spatial maps*) eine große Bedeutung für das räumliche Gedächtnis und für die Fähigkeit zur räumlichen Orientierung hat (O'Keefe und Nadel 1978). In verwandten theoretischen Ansätzen wurde außerdem vermutet, dass der Hippocampus wichtige Funktionen bei der Verarbeitung kontextabhängiger, sowie relationaler Informationen und Assoziationen übernimmt (Hirsh 1974, Sutherland und Rudy 1989). Auch hier konnte in Läsionsstudien gezeigt werden, dass Ratten mit Schädigungen des Hippocampus eine verringerte Lernfähigkeit bei der Unterscheidung von miteinander assoziierten und nicht miteinander assoziierten Gerüchen aufweisen (*odor-guided paired-associate learning task*: Cohen und Eichenbaum 1993). Andere Autoren bringen die Funktionen des Hippocampus mit der Verarbeitung und Bewertung von neuen Informationen (engl. *novelty*), sowie mit der Vermittlung von sogenannten *approach-avoidance* Konflikten, in denen eine Situation oder eine Konsequenz sowohl positive, als auch negative Charakteristiken aufweist, in Verbindung (Gray und McNaughton 2003).

Im Gegensatz zur Funktionalität des Hippocampus ist dessen anatomischer Aufbau besser verstanden. Der Hippocampus der Ratte wird in drei funktionelle und anatomisch getrennte Areale eingeteilt (Abbildung 3). Die Übergänge zwischen diesen sind allerdings nicht klar abgegrenzt, sondern verlaufen in einem Gradienten entlang der septo-temporalen Achse. Während der dorsale Bereich mit der Verarbeitung räumlicher Informationen und Bildung räumlicher Karten in Verbindung gebracht wird, wird die Regulierung sensomotorischer Pro-

zesse dem ventralen Bereich des Hippocampus zugeschrieben (Bast und Feldon 2003; Chen et al. 2010; McHugh et al. 2011). Der intermediäre Bereich des Hippocampus integriert die Funktionen des dorsalen, wie auch des ventralen Hippocampus und kann Schädigungen dieser Areale kompensieren (Bast et al. 2009; Bast 2011). Des Weiteren zeigen anatomische Studien, dass der Hippocampus starke neuronale Verschaltungen zwischen diesen drei intrahippocampalen Arealen aufweist (Amaral und Witter 1989). Diese drei hippocampalen Areale werden auf zellulärer Ebene jeweils in die Felder des Ammonshorn (*cornu ammonis*; CA1, CA2 und CA3) eingeteilt und als *hippocampus proper* bezeichnet. In der Literatur herrscht jedoch Uneinigkeit über die Verwendung des Hippocampus-Begriffs und aus diesem Grund wird häufig der umfassendere Begriff der Hippocampus-Formation verwendet, um eine Reihe anatomisch- und zytoarchitektonisch-getrennter Areale mit räumlicher Nähe innerhalb der Hippocampus-Region zu beschreiben. Aber auch diese Begriffsverwendung findet in der Literatur nicht einheitlich statt: Einige Autoren zählen zur Hippocampus-Formation das Subiculum und den Gyrus dentatus (Martin 2003), während andere Autoren zusätzlich den entorhinalen Kortex, sowie das Prä- und Parasubiculum als Teil der Hippocampus-Formation definieren (Amaral und Lavenex 2007).

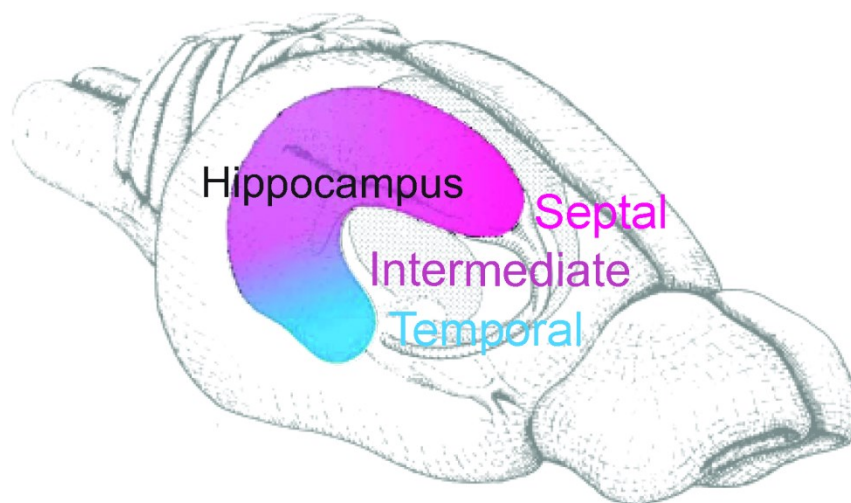


Abbildung 3: Schematische Darstellung der räumlichen Position des Hippocampus im Gehirn der Ratte (verändert nach Bast 2009). Der Farbgradient korrespondiert mit dem funktionellen und anatomischen Gradienten des Hippocampus entlang der septo-temporalen Achse. Septale (dorsale) Regionen des Hippocampus verarbeiten räumliche Informationen, während temporale (ventrale) Regionen sensomotorische Prozesse regulieren. Das intermediäre Areal des Hippocampus integriert die Funktionen der septalen und temporalen Bereiche.

2.5 Die „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie

Die mit den verschiedenen Gedächtnissystemen assoziierten Hirnareale verfügen über eine Vielzahl an neuronalen Verschaltungen und diese Vernetzung lässt eine gegenseitige Beeinflussung als naheliegend erscheinen (Krayniak et al. 1981; Swanson und Köhler 1986; Groenewegen et al. 1987; McGeorge and Faull 1989; Wright und Groenewegen 1995). White und McDonald (2002) etablierten mit ihrer „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie einen

theoretischen Bezugsrahmen, um Kooperation oder Konkurrenz zwischen verschiedenen Gedächtnissystemen beschreiben und erklären zu können. Sie beschreiben drei zentrale, neuronale Verarbeitungssysteme in ihrer Theorie: Das System des Hippocampus, das System des dorsalen Striatum und das System der Amygdala. Jedes dieser Systeme erhält ähnliche Informationseingänge, deren Verarbeitung parallel, d.h. auf eine spezifische Art und Weise, erfolgt (Dissoziation). Gleichzeitig findet jedoch auch eine gegenseitige Einflussnahme zwischen diesen Systemen statt (Kooperation), wie in verschiedenen empirischen Studien gezeigt werden konnte (Interaktion zwischen Amygdala und Hippocampus bei der Furchtkonditionierung: Rudy et al. 2004; Interaktion zwischen Amygdala und Striatum bei der klassischen Konditionierung: Corbit und Balleine 2005; Corbit und Janak 2007). Der Informationsausgang erfolgt wiederum parallel in dieselben nachgeschalteten Hirnareale (Konkurrenz/Interferenz) und resultiert letztendlich direkt oder indirekt in ausgeführten Verhaltensweisen (Abbildung 4). Wie stark die Prozesse der Dissoziation, Kooperation und Konkurrenz sind, ist Bestandteil anhaltender Debatten über diese Theorie (White et al. 2013).

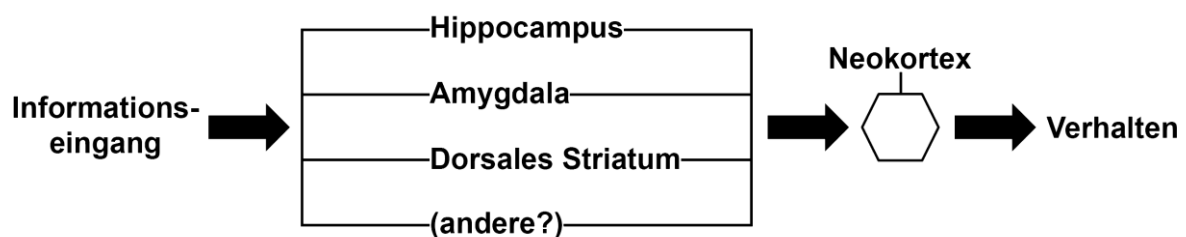


Abbildung 4: Modell der parallelen Gedächtnissysteme (nach White und McDonald 2002). Eingehende sensorische Informationen werden in den Hirnarealen des Hippocampus, des Striatum und der Amygdala parallel verarbeitet und dann an nachgeschaltete Strukturen weitergeleitet. Trotz der parallelen Informationsverarbeitung kann es auch zu einer gegenseitigen Einflussnahme (Kooperation) der Hirnareale kommen. Auf der Ebene des Neokortex laufen die Informationen zusammen, werden weiterverarbeitet und resultieren dann in ausgeführten Verhaltensabläufen.

Die zugrundeliegenden Prämissen der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie basieren zum einen auf anatomischen Befunden über den neuronalen Signalfuss innerhalb und zwischen den verschalteten Hirnarealen, sowie deren parallele Projektion auf Strukturen, die für das Ausführen von Verhaltensweisen zuständig sind (z.B. präfrontaler Kortex). Zum anderen stützen McDonald und White ihre Theorie mit den Ergebnissen aus Läsions- und Verhaltensstudien: Diese deuten darauf hin, dass eine Manipulation der zentralen Verarbeitungssysteme zu einer Veränderung in der Präferenz bestimmter Verhaltensweisen führt, was wiederum auf eine gegenseitige Interaktion der zentralen Verarbeitungssysteme hinweist. So konnten die Autoren bereits einige Jahre zuvor nachweisen (McDonald und White 1994), dass Hippocampus und dorsales Striatum für unterschiedliche Verhaltensstrategien verantwortlich sind. McDonald und White trainierten hierfür Ratten mit Läsionen entweder des Fornix, sowie Teilen des dorsalen Hippocampus, oder des dorsalen Striatum in einer Variante

des Morris-Wasserlabyrinths. Die Versuchstiere wurden zuerst über mehrere Tage darauf trainiert eine sichtbare Plattform innerhalb des Wasserlabyrinths zu finden. In einer anschließenden Testphase wurde die Fähigkeit der Ratten untersucht die sichtbare Plattform zu finden, wenn diese im Vergleich zur Trainingsphase räumlich verschoben war. Für einen weiteren Test wurde die Plattform unter die Wasseroberfläche abgesenkt und die Versuchstiere mussten die nun unsichtbare Plattform erreichen. Die Ergebnisse aus den Tests ließen Rückschlüsse auf die bevorzugte Lern- und Verhaltensstrategie der beiden Experimentalgruppen zu: In Abhängigkeit des lädierten neuronalen Areals zeigten die Versuchstiere eine höhere Präferenz für die Lernstrategie, mit der das jeweils andere, nicht beschädigte Verarbeitungssystem assoziiert ist (Läsion des dorsalen Striatum → Präferenz für eine räumliche Lernstrategie; Läsion des Fornix → Präferenz für eine Reiz-Reaktions-Lernstrategie). Im Gegensatz zu diesen beiden Experimentalgruppen zeigte eine unbehandelte Gruppe von Ratten keine Präferenz für eine der beiden Strategien. Die Autoren interpretierten das Fehlen einer klaren Präferenz für eine Verhaltensstrategie damit, dass bei den unbehandelten Ratten beide neuronale Areale intakt waren und somit die gleichwertige Möglichkeit für das Erlernen und Ausführen beider Strategien bestand. Individuelle Unterschiede zwischen den Ratten würden dann zu einer Bevorzugung einer bestimmten Strategie führen (McDonald und White 1994). Ähnliche Befunde konnten auch in anderen Läsionsstudien gefunden werden (Thompson et al. 1980; Okaichi 1987).

Neben der Studie von McDonald und White konnte die „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie mit einer Vielzahl an weiteren empirischen Befunden gestützt werden: Die parallele Informationsverarbeitung der drei zentralen Systeme konnte mit den bereits erwähnten Paradigmen der Outcome-Devaluation (Sage und Knowlton 2000; Yin und Knowlton 2002) und der Hirnläsion bzw. temporären Inaktivierung von neuronalen Arealen (Packard und McGaugh 1992, 1996) nachgewiesen werden. Andere Studien konnten durch den Einsatz pharmakologischer Manipulationen **nach** einer instrumentellen Konditionierung weitere Hinweise darauf liefern, dass die beteiligten Strukturen an der Verarbeitung und Speicherung unterschiedlicher Informationen beteiligt sind (Breen und McGaugh 1961; McGaugh 1966; Packard und White 1991; White und Milner 1992; Packard und Teather 1997; Packard 1999). Befunde für eine kooperative Interaktion zwischen den neuronalen Systemen konnte mit den Methoden der Furchtkonditionierung (LeDoux et al. 1988; Goldstein et al. 1996; Lee und Kim 1998; Übersichtsartikel siehe Rudy et al. 2004) und des *Pavlovian-to-instrumental transfer* erbracht werden (Corbit und Balleine 2005; Corbit und Janak 2007). Weiterhin konnten Läsion- und Mikroinfusionsstudien an Arealen des präfrontalen Kortex Hinweise darauf liefern, dass dieser als Verarbeitungsort für den Signalfuss aus Hippocampus, Striatum und Amygdala dient. Einige Autoren vermuten aus diesem Grund eine konkurrierende Interaktion (Interferenz) zwischen den drei Verarbeitungssystemen auf funktioneller Ebene des präfron-

talen Kortex (de Bruin et al. 1997; Ragozzino et al. 1999; Coutureau und Killcross 2003; Killcross und Coutureau 2003; McDonald et al. 2007; Rich und Shapiro 2007; Übersichtsartikel siehe White et al. 2013).

2.6 Das Phänomen der Leistungsverbesserung nach einer Hirnläsion

Viele der durchgeführten Forschungsvorhaben, deren Ergebnisse sich im Rahmen der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie interpretieren lassen, konzentrierten sich vor allem auf die Erzeugung von Lern- und Gedächtnisdefiziten (McDonald und White 1994; Gruart et al. 2006; McHugh und Tonegawa 2009; Clark und Squire 2010). Jedoch bietet die Theorie, im Angesicht der postulierten konkurrierenden Interaktion zwischen den Gedächtnissystemen, auch die Möglichkeit der Erklärung von Lern- und Gedächtnisverbesserungen nach der Läsion von Arealen dieses Netzwerks.

Der Befund einer Leistungsverbesserung nach der permanenten oder temporären Inaktivierung eines neuronalen Areals ist, trotz des kontraintuitiven Charakters, schon seit fast 100 Jahren ein immer wieder auftretendes Phänomen in der neurowissenschaftlichen Forschung. Bereits im Jahr 1920 konnte Karl Lashley mit einem Helligkeit-Unterscheidungstest bei Ratten mit Läsionen des Neokortex feststellen, dass diese zwar Lähmungen zeigten, in dem verwendeten Paradigma jedoch eine bessere Leistung erzielten als eine unbehandelte Kontrollgruppe. Lashley interpretierte diesen Befund so, dass die induzierten motorischen Einschränkungen den Ratten mit einer Läsion, aufgrund der spezifischen Verhaltensanforderungen des Tests, einen Vorteil boten (Lashley 1920). In den nachfolgenden Jahrzehnten waren vor allem Läsionen des Hippocampus immer wieder Bestandteil experimenteller Studien, in denen das Phänomen der Leistungsverbesserung nach einer Schädigung oder Inaktivierung dieses neuronalen Areals mit einer Vielzahl unterschiedlicher Paradigmen gezeigt werden konnte. So konnten Leistungsverbesserungen nach Läsionen des Hippocampus bei Hunden (klassische Konditionierung olfaktorischer Reflexe; Allen 1940) und Ratten (Vermeidungsverhalten; Isaacson et al. 1961) nachgewiesen werden. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts folgte eine Reihe weiterer Publikationen, die über Leistungsverbesserungen nach einer Hippocampus-Läsion in Tests des Vermeidungsverhaltens (King 1958; Green et al. 1967; Olton und Isaacson 1968; Tonkiss et al. 1990; Weiner et al. 1998; Pouzet et al. 1999), der klassischen Konditionierung (Klüver 1965; Schmaltz und Theios 1972) und instrumentellen Lernaufgaben (Ehrlich 1963; Clark und Isaacson 1965; Schmaltz und Isaacson 1966; Brown et al. 1969; Means et al. 1970; Zola und Mahut 1973; Devenport und Holloway 1980; Jaldow et al. 1989; Packard et al. 1989; Gallagher und Holland 1992; Schmelzeis und Mittleman 1996) berichteten. Trotz der vielen empirischen Befunde besteht bis heute jedoch keine Einigkeit über die kausalen Zusammenhänge von neurologischen Schädigungen und den beobachteten Lern- bzw. Leistungsverbesserungen. Zusätzlich finden sich in der Literatur seit der Jahrtausendwende immer wieder Berichte über das Phänomen der verbesserten

Leistung nach einer Läsion des Hippocampus oder angrenzender Strukturen (Schroeder et al. 2002; Guillazo-Blanch et al. 2002; Desmedt et al. 2003; Compton 2004; Lee und Kim 2004; Cheung und Cardinal 2005; Kwok und Buckley 2009; Sanderson et al. 2012).

Das Auftreten einer Leistungsverbesserung hängt somit möglicherweise von der Art der gestellten Lern- bzw. Gedächtnisaufgabe ab (Wirth et al. 1998; Ito et al. 2005). Erfordert eine Aufgabe hauptsächlich die räumliche Lernfähigkeit, so könnte das Wegfallen des potenziell konkurrierenden instrumentellen Lern- und Gedächtnissystems durch z.B. eine Läsion des dorsalen Striatum zu einer Leistungsverbesserung in einer räumlichen Lernaufgabe, und *vice versa*, führen. Ein vergleichbarer Effekt konnte von Eckart et al. (2012) aufgezeigt werden: Ratten mit Läsion des dorsalen Hippocampus zeigten im Verlauf des instrumentellen Trainings im SRTT höhere Reaktionsgeschwindigkeiten, sowie geringere Fehlerraten als scheinoperierte Ratten oder eine unbehandelte Kontrollgruppe. Die Autoren interpretierten diese Ergebnisse als eine Folge der Schädigung des Hippocampus, welches zu einer Auflösung der konkurrierenden Interaktion zwischen striatalen Reiz-Reaktions-Lernen und hippocampalen räumlichen Lernen führte. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit greifen die Ergebnisse von Eckart et al. (2012) auf und versuchen das Phänomen der instrumentellen Leistungsverbesserung infolge einer dorsalen Hippocampus-Läsion im Kontext der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie umfassender zu charakterisieren.

3. Fragestellung der Arbeit

Die Interpretation des Befundes von Eckart et al. (2012) wurde jedoch dadurch erschwert, dass alle Versuchstiere nach dem Abschluss der Shaping-Phase täglich in 20-minütigen Sitzungen trainiert wurden. Aufgrund dieses zeitlichen Kriteriums war es nicht auszuschließen, dass die Ratten der Läsionsgruppe, durch die von der Läsion ausgelösten Leistungsverbesserungen, zusätzlich weitaus mehr Lernerfahrung sammeln konnten, da sie in der gleichen Zeit mehr FR-13-Sequenzen absolvieren konnten, als dies bei der Kontroll- und scheinoperierten-Gruppe der Fall war.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bauen auf diesen experimentellen Befunden auf und führen eine Analyse von Leistungssteigerungen und möglicher Lern- und Gedächtnisverbesserungen nach der Läsion des dorsalen Hippocampus im Tiermodell der Ratten mit folgenden Fragestellungen fort:

Studie 1: Bleibt eine Leistungsverbesserung nach der Läsion des dorsalen Hippocampus erhalten, wenn für die maximale Menge möglicher Lernerfahrung pro Sitzung kontrolliert wird? Um diese Frage zu klären, wurde statt eines zeitlichen Kriteriums ein quantitatives Kriterium für das Abschließen jeder Trainingssitzung verwendet (20 FR-13-Sequenzen anstatt 20 Minuten Zeitlimit).

Führt die Läsion des dorsalen Hippocampus zu Verhaltensänderungen, die eine Leistungsverbesserung im SRTT begünstigen? Hierzu wurde ein Extinktions-Test durchgeführt, um eine mögliche Beeinträchtigung des Extinktionslernens bei Ratten mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus zu untersuchen.

Studie 2: Handelt es sich bei der beobachteten Leistungssteigerung nach der Läsion des dorsalen Hippocampus um eine spezifische Verbesserung des sequenziellen Lernens oder um eine allgemeine Verbesserung des instrumentellen Lernens? Hierzu wurden die Versuchstiere zuerst mit einer pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation trainiert und anschließend wurde ein Wechsel auf eine sequenzielle Stimulus-Präsentation vorgenommen.

Finden sich Verhaltensveränderungen nach einer Läsion des dorsalen Hippocampus auch in Verhaltensweisen, die nicht zur Lösung der gestellten instrumentellen Lernaufgabe benötigt werden? Hierzu wurden Videoaufzeichnungen der Trainingssitzungen auf verschiedene Verhaltensparameter hin untersucht (Inaktivität, Putzverhalten, Schnüfferverhalten, Aufrichteverhalten, aufgabenbezogenes Verhalten).

Lässt sich eine Beeinträchtigung des Extinktionslernens bei Ratten mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus, wie sie in Studie 1 gefunden wurde, auch mit einer devaluierten Futterbelohnung nachweisen? Hierzu wurde ein Devaluation-Extinktionstest vorgenommen, bei dem alle Versuchstiere zuvor gesättigt wurden.

Studie 3: Zeigen Ratten mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus eine Beeinträchtigung in der Erkennung und Diskriminierung von R-O-Assoziationen? Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein selbstentwickelter R-O-Dissoziationstest eingesetzt, bei dem alle Ratten zunächst bis zu ihren individuellen Leistungsmaxima im SRTT trainiert wurden. Durch eine alternierende Veränderung der R-O-Kontingenz sollte anschließend ein mögliches Defizit in der Experimentalgruppe aufgedeckt werden. Hierzu wurde in jeder Testsitzung mehrfach zwischen dem FR-13-Verstärkerplan und einem R-O-entkoppelten Verstärkerplan gewechselt.

4. Zusammenfassung der Publikationen

4.1. Studie 1: Prozedurale Leistungsverbesserungen nach exzitotoxischer Hippocampus-Läsion in der Ratten-Variante des seriellen Reaktionszeit-Test

Hintergrund: Es herrscht weitgehende Übereinstimmung in der Literatur über die funktionelle Rolle des Hippocampus für das episodische und räumliche Gedächtnissystem (deklaratives Gedächtnis) in einer Vielzahl verschiedener Spezies (u.a. Nagetiere). Eckart et al. (2012) konnten jedoch zeigen, dass exzitotoxische Läsionen des dorsalen Hippocampus bei Ratten zu einer Leistungsverbesserung des instrumentellen Lernens (nichtdeklaratives Gedächtnis) in der Ratten-Variante des SRTT führten. Dieser Befund warf die Frage auf, inwiefern der

Hippocampus Einfluss auf Gedächtnisfunktionen abseits des deklarativen Gedächtnissystems hat und wie eine Läsion dieses neuronalen Areals zu einer Verbesserung des Lernens von Reiz-Reaktions-Mustern oder des sequenziellen Lernens führen kann. Da in der Studie von Eckart et al. (2012) ein Trainingsplan mit täglichen, 20-minütigen Sitzungen zum Einsatz kam, musste jedoch zuerst untersucht werden, ob die gefundenen Leistungsverbesserungen auch dann noch bestehen blieben, wenn für die individuelle Lernmenge kontrolliert wird. Ein zeitliches Kriterium hätte Ratten mit einer, durch die Hippocampus-Läsion ausgelösten, Leistungssteigerung zusätzlich bevorteilt, da sie in der gleichen Zeit insgesamt mehr FR-13-Sequenzen als eine Kontroll- oder schein-operierte Gruppe hätten absolvieren können. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde in dieser Studie eine fixe Menge von 20 FR-13-Sequenzen pro Sitzung festgelegt. Zusätzlich kam ein Extinktionstest zum Einsatz, um ein mögliches Defizit im Extinktionslernen der Experimentalgruppe aufzudecken.

Methoden: 22 männliche Wistar-Ratten wurden in drei Gruppen eingeteilt: Läsions-, Kontroll- und schein-operierte Gruppe. Die 8 Ratten der Läsionsgruppe wurden einer bilateralen, exzitotoxischen Läsion des dorsalen Hippocampus durch Ibotensäure-Injektionen unterzogen, während die 7 Ratten der schein-operierten Gruppe nur dem chirurgischen Eingriff unterzogen wurden und anstelle von Ibotensäure- Kochsalzlösung-Injektionen erhielten. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Nach einer Erholungszeit von 14 Tagen wurde mit Hilfe eines Objekt-Ort-Wiedererkennungstest die räumliche Lernfähigkeit aller Versuchstiere untersucht. Anschließend begann die ca. 7 Tage andauernde Shaping-Phase, in welcher alle Ratten auf das FR-13-Kriterium angelernet wurden. Es folgte eine 17-tägige Trainingsphase, in der alle Versuchstiere an das Leistungsmaximum trainiert wurden. Während dieser Phase wurden Reaktionszeit, Genauigkeit, Versuchszeit und Länge der Nachverstärkungspause aufgezeichnet. Nach Abschluss der Trainingsphase wurden drei weitere Tests durchgeführt: Es kam ein sogenannter *Sequence Violation Test* zum Einsatz, in dem die Versuchstiere erneut 20 FR-13-Sequenzen präsentiert bekamen. Allerdings wurde bei 6 dieser Sequenzen das 9. Item der Sequenz übersprungen, womit eine Verletzung der erlernten Sequenz erzeugt wurde. In einem zweiten Test (*Sequence-Random Test*) wurden 10 der FR-13-Sequenzen in der gewohnten sequenziellen Reihenfolge präsentiert. Mit Beginn der 11. Sequenz wurde jedoch auf eine pseudorandomisierte Stimulus-Präsentation gewechselt. In einem finalen Extinktionstest wurden nach dem Ende der 10. FR-13-Sequenz die verwendeten Futterspender deaktiviert und alle Versuchstiere konnten beliebig viele FR-13-Sequenzen abschließen. Das Programm endete automatisch, nachdem eine Ratte für einen Zeitraum von 5 Minuten keine Interaktion, d.h. korrekte oder inkorrekte *nose pokes*, mehr gezeigt hatte.

Ergebnisse: Die histologische Analyse der Rattengehirne zeigte, dass die Versuchstiere der Läsionsgruppe ein um 46 – 58% verringertes Hippocampus-Volumen in beiden Hemisphären im Vergleich zur Kontroll- und schein-operierten Gruppe aufwiesen. Der Objekt-Ort-Wiedererkennungstest konnte ein klares Defizit der Läsionsgruppe in der räumlichen Lernfähigkeit bestätigen (siehe Abbildung 2, Studie 1). Die Daten des SRTT-Trainings zeigten, dass sich die drei Gruppen über den Verlauf des Trainings nicht in ihrer Genauigkeit unterschieden. Auch für die Reaktionszeit konnte nur ein signifikanter Unterschied am Beginn der Trainingsphase festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen verringerten sich mit fortschreitender Trainingsdauer. Im Gegensatz dazu konnten jedoch deutliche Unterschiede zwischen der Läsionsgruppe und der Kontroll- bzw. schein-operierten Gruppe in den Variablen der Versuchszeit und der Nachverstärkungspause gefunden werden: Die Versuchstiere der Läsionsgruppe beendeten die individuellen Trainingssitzungen signifikant schneller als die anderen beiden Gruppen (siehe Abbildung 5, Studie 1) und zeigten gleichzeitig zwei- bis dreifach geringere Nachverstärkungspausen als die Kontroll- und schein-operierte Gruppe (siehe Abbildung 6, Studie 1). Während des *Sequence Violation Tests* zeigten Läsions- und Kontrollgruppe signifikant höhere Reaktionszeiten am übersprungenen 9. Item der Sequenz. Dieser Effekt war jedoch nicht in den schein-operierten Tieren zu beobachten. Der *Sequence-Random Test* zeigte eine Verringerung der Reaktionszeiten und der Genauigkeit während der pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation in allen drei Gruppen. Der finale Extinktionstest zeigte eine deutliche Beeinträchtigung des Extinktionslernens bei den Ratten der Läsionsgruppe (siehe Abbildung 9, Studie 1).

Diskussion: Der Befund einer verbesserten Leistung im SRTT von Ratten mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus konnte auch mit einer festen Menge an Lernerfahrung pro Versuchstier bestätigt werden. Die beobachteten Effekte traten nun jedoch nicht mehr, wie zuvor bei Eckart et al. (2012), in den Variablen der Reaktionszeit und der Genauigkeit auf, sondern konnten stattdessen anhand der verringerten Dauer der Versuchszeit und den kürzeren Nachverstärkungspausen gefunden werden. Die geringere Versuchszeit der Läsionsgruppe war vermutlich ein Teilresultat der kürzeren Nachverstärkungspause, auch wenn diese Verkürzung die geringere Versuchszeit nicht vollständig erklären konnte. Die Annahme, dass es noch zu weiteren Verhaltensänderungen bei den Versuchstieren mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus kam, ist naheliegend. Frühere Studien zeigten, dass eine Läsion des Hippocampus bei Ratten zu einer reduzierten Wahrnehmung aversiver oder ablenkender Stimuli führen kann (Machado and Bachevalier 2008; Chudasama et al. 2008, 2009). Ebenso konnten als Folge von Hippocampus-Läsionen eine Verringerung emotionaler Reaktionen, sowie eine Verlagerung des Verhaltens in einen Zustand, in dem dieses vorrangig durch äußere Stimuli und weniger durch motivationale Zustände gesteuert wird (vgl. *habit learning*), beo-

bachtet werden (Kimble 1968; Coover et al. 1971; Isaacson and Kimble 1972; Hirsh 1974; Simonov 1974, 1991). Die in der vorliegenden Studie gefundenen Defizite der Läsionsgruppe im Extinktionslernen decken sich ebenfalls mit empirischen Daten aus früheren Publikationen (Coover et al. 1971; Hirsh 1974; Rawlins et al. 1980) und deuten im Zusammenhang mit den verkürzten Nachverstärkungspausen und der reduzierten Versuchsdauer auf weitreichende Verhaltensveränderungen hin, die im Rahmen der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie mit dem Verlust dorsaler Hippocampus-Funktionen und der daraus folgenden Stärkung anderer Gedächtnissysteme, wie dem prozeduralen Gedächtnis, erklärt werden kann.

4.2. Studie 2 und Studie 3: Entkopplung der Reaction-Outcome-Kontingenz: Läsionen des dorsalen Hippocampus führen zu instrumentellen Leistungsverbesserungen, beeinträchtigen jedoch die Verhaltensflexibilität von Ratten

Hintergrund: Auf Basis der Befunde von Studie 1 wurden zwei weitere Experimente durchgeführt, um die Auswirkungen von dorsalen Hippocampus-Läsionen auf die Verhaltensabläufe von Ratten im Kontext des SRTT zu untersuchen. Die Leistungsverbesserungen des instrumentellen Lernens in der Läsionsgruppe blieben auch bei einer konstanten Menge an Training erhalten, waren jedoch vorrangig in der Versuchszeit zu beobachten. Gleichmaßen konnten deutlich kürzere Nachverstärkungspausen und eine Beeinträchtigung des Extinktionslernens in der Läsionsgruppe gefunden werden. Die Befunde aus Studie 1 deuteten somit auf weitreichende Verhaltensveränderungen bei den Ratten mit Läsionen des dorsalen Hippocampus hin. Ein Interpretationsansatz für diese veränderten Verhaltensabläufe lässt sich in der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie finden. Die Autoren White und McDonald (2002) postulierten in ihrer Theorie die Existenz einer gegenseitigen Einflussnahme verschiedener Gedächtnissysteme und deren zugrundeliegende neuronale Areale und deuten damit eine mögliche Konkurrenz zwischen hippocampalen und striatalen Gedächtnissystemen auf der Ebene neokorticaler Strukturen an (McDonald et al. 2004, 2007; Gruber und McDonald 2012; McDonald und White 2013; White et al. 2013). Eine Läsion des Hippocampus könnte im Kontext dieses theoretischen Bezugsrahmens in einem Wegfall der konkurrierenden Interaktion resultieren, wodurch striatale Funktionen und der Informationsfluss in z.B. den präfrontalen Kortex gestärkt werden. Für die Klärung dieser Frage musste jedoch zuerst überprüft werden, ob es sich bei der gefundenen Leistungsverbesserung um eine spezifische Stärkung des sequenziellen Lernens oder um eine Verbesserung allgemeiner, instrumenteller Lernprozesse handelte. Hierzu wurden in Studie 2 alle Versuchstiere mit einer pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation trainiert. Zusätzlich kam ein Devaluation-Extinktionstest zum Einsatz, um ein mögliches Defizit im Extinktionslernen auch bei einer entwerteten Futterbelohnung aufzudecken. Während des gesamten Trainingszeitraums wurden Videoaufzeichnungen der Versuchstiere gemacht, um Veränderungen von nicht-aufgabenrelevanten Verhaltensabläufen zu analysieren. Eine Stärkung striataler Prozesse

nach der Läsion des dorsalen Hippocampus könnte außerdem zu einer Verlagerung der Lernprozesse auf S-R-Assoziationen (*habit learning*) führen (Dickinson et al. 1995; Graybiel 2008). Um diese Hypothese zu testen, wurde in Studie 3 jeweils eine weitere Läsions- und Kontrollgruppe unter einer pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation trainiert und nach dem Ende der Trainingsperiode in einer R-O-Dissoziations-Aufgabe getestet. Mit diesem Test sollten mögliche Defizite in der Erkennung von alternierenden R-O-Kontingenzen, sowie in der allgemeinen Verhaltensflexibilität aufgedeckt werden.

Methoden: Insgesamt wurden 41 männliche Wistar-Ratten in beiden Studien verwendet. In Studie 2 wurden 25 Tiere in drei Gruppen eingeteilt (Läsionsgruppe: n = 11; Kontrollgruppe: n = 8; schein-operierte Gruppe: n = 6) und in Studie 3 wurden 16 Versuchstiere in zwei Gruppen eingeteilt (Läsionsgruppe: n = 9; Kontrollgruppe: n = 7). Die verwendeten Operations- und Läsionsprozeduren waren identisch mit denen der ersten Studie. Für die Trainingsphase wurde in beiden Studien eine pseudorandomisierte anstatt einer sich wiederholenden Stimulus-Präsentation verwendet.

Nachdem alle Versuchstiere in Studie 2 ihr Leistungsmaximum unter einer pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation erreicht hatten, wurde für 6 weitere Tage auf eine sich wiederholende Stimulus-Präsentation umgeschaltet, um die Möglichkeit einer weiteren Leistungssteigerung zu untersuchen. Pseudorandomisierte und sich wiederholende Stimulus-Präsentation wurden auf Unterschiede in der Reaktionszeit, Genauigkeit, Versuchszeit und den Nachverstärkungspausen hin untersucht. Während der gesamten Trainingsperiode wurden Videoaufzeichnungen aller Versuchstiere gemacht. Die Videoaufnahmen des 1. und 15. Trainingstags wurden quantitativ auf fünf verschiedene Verhaltensparameter untersucht: Inaktivität, Putzverhalten, Schnüffelverhalten, Aufrichteverhalten, aufgabenbezogenes Verhalten (für eine detaillierte Beschreibung der Parameter siehe Material und Methoden von Studie 2). Nach Abschluss der Trainingsphase wurde ein Devaluation-Extinktionstest durchgeführt, bei dem alle Ratten direkt vor dem Versuch *ad libitum* Zugang zu Futterpellets hatten. Die erfolgreiche Sättigung konnte durch eine deutliche Gewichtszunahme am Tag des Tests bestätigt werden. Während des Devaluation-Extinktionstests wurde der Futterspender deaktiviert und die Versuchstiere erhielten für erfolgreich abgeschlossene FR-13-Sequenzen keine Futterbelohnung. Der Versuch endete automatisch, nachdem eine Ratte für einen Zeitraum von 3 Minuten kein instrumentelles Verhalten, d.h. keine korrekten oder inkorrekten *nose pokes*, mehr gezeigt hatte.

Nach Beendigung der Trainingsphase in Studie 3 wurden alle Versuchstiere mit einer R-O-Dissoziations-Aufgabe auf mögliche Defizite in ihrer Verhaltensflexibilität getestet. Hierzu wurde der übliche FR-13-Verstärkerplan mit einer pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation verwendet. Nach 8 erfolgreich abgeschlossenen FR-13-Sequenzen wurde auf

einen R-O-entkoppelten Verstärkerplan gewechselt: Die *nose poke* Öffnungen wurden weiterhin in der pseudorandomisierten Abfolge beleuchtet und die Ratten konnten wie zuvor in diese Öffnungen *poken*. Die Tiere erhielten aber nicht mehr nach 13 korrekten *pokes* eine Futterbelohnung. Stattdessen wurden nach dem Ablauf eines 30-sekündigen Zeitintervalls automatisiert 4 Futterpellets in die Raufe eingeworfen, unabhängig von den Handlungen der Versuchstiere. Nach 8 erneuten Futterbelohnungen wurde wieder auf den FR-13-Verstärkerplan gewechselt, um dann nach 8 weiteren Belohnungen ein zweites Mal auf den R-O-entkoppelten Verstärkerplan zu wechseln. Der Testablauf konnte somit in 4 Phasen eingeteilt werden: R-O-gekoppelte Phasen (Phase C1 und Phase C2) und R-O-entkoppelte Phasen (Phase D1 und Phase D2). Nach insgesamt 32 Futterbelohnungen wurde der Versuch beendet. Diese R-O-Dissoziations-Aufgabe wurde an 10 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Um ein vergleichbares Maß für die Leistung der Versuchstiere zwischen den unterschiedlichen Phasen zu erhalten, wurden die *pokes* pro Sekunde (*pokes per second*; PPS) errechnet. In dieses Maß flossen sowohl korrekte, als auch inkorrekte *pokes* ein. Verglichen wurden Testtag 1, 5 und 10.

Ergebnisse: Die histologische Analyse der Rattengehirne zeigte, dass die Versuchstiere der Läsionsgruppe in beiden Studien ein um 43 – 59% verringertes Hippocampus-Volumen in beiden Hemisphären im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Alle Versuchstiere in Studie 2 erreichten ihr Leistungsmaximum nach 16 Trainingstagen. Vergleichbar zu den Ergebnissen von Studie 1 gab es keine Unterschiede in der Genauigkeit zwischen den Gruppen. Die schein-operierte Gruppe zeigte über den Verlauf der Trainingsperiode eine signifikant höhere Reaktionszeit als die anderen beiden Gruppen, während Läsions- und Kontrollgruppe keine Unterschiede zueinander aufwiesen. Die Ratten der Läsionsgruppe beendeten die Versuche erneut schneller als die Kontroll- und schein-operierte Gruppe und zeigten, ebenso wie in Studie 1, signifikant kürzere Nachverstärkungspausen. Der Wechsel von einer pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation auf eine sich wiederholende Stimulus-Präsentation für insgesamt 6 weitere Tage an Trainingstag 17, brachte eine statistisch signifikante Leistungsverbesserung bei allen Versuchstieren mit sich. Die deskriptive Analyse (siehe Tabelle 1, Studie 2) zeigte jedoch nur geringe Veränderungen in allen 4 getesteten Variablen nach dem Wechsel auf eine sich wiederholende Stimulus-Präsentation. Der Devaluation-Extinktionstest zeigte, dass die Läsionsgruppe bei ausbleibender Futterbelohnung insgesamt mehr FR-13-Sequenzen abschloss und mehr Zeit benötigte, bis das zeitliche Kriterium von 3 Minuten Inaktivität erreicht wurde, als Kontroll- und schein-operierte Gruppe. Die statistische Analyse ergab jedoch nur Unterschiede auf einem Trend-Niveau. Die Auswertung der Verhaltensabläufe an Trainingstag 1 und Trainingstag 15 zeigte, dass Läsions- und Kontrollgruppe zu Beginn der Trainingsperiode keine Unterschiede in 4 der 5 untersuchten Verhaltensparameter

aufwiesen. Nur mit dem aufgabenbezogenen Verhalten verbrachte die Läsionsgruppe weniger Zeit als die Kontrollgruppe. Im Verlauf des Trainingszeitraums vergrößerten sich jedoch die Unterschiede: Am Trainingstag 15 zeigte die Läsionsgruppe eine signifikante Verringerung aller 5 Verhaltensparameter. Im Gegensatz dazu konnte bei der Kontrollgruppe nur eine nicht signifikante Verringerung der Inaktivität und eine statistisch signifikante Verringerung der Zeit, die mit aufgabenbezogenem Verhalten verbracht wurde, beobachtet werden. Die Parameter des nicht-aufgabenbezogenen Verhaltens (Putzverhalten, Schnüfferverhalten und Aufrichteverhalten) zeigten keine Veränderung gegenüber Trainingstag 1 (siehe Abbildung 4, Studie 2).

Die Daten des SRTT-Trainings in Studie 3 zeigten ein vergleichbares Muster wie es bereits in Studie 1 und 2 zu beobachten war: Läsions- und Kontrollgruppe unterschieden sich im Verlauf des Trainings nicht in den Reaktionszeiten und der Genauigkeit. Die Versuchszeit und die Nachverstärkungspausen waren in der Läsionsgruppe jedoch signifikant kürzer. Alle Tiere erreichten ihr Leistungsmaximum nach 18 Tagen SRTT-Training. In der anschließenden R-O-Dissoziations-Aufgabe zeigte die Kontrollgruppe am ersten Testtag ein eindeutiges Sägezahnmuster, d.h. während der C-Phasen waren mehr PPS und somit eine schnellere Reaktionszeit als während der D-Phasen zu beobachten. Die Läsionsgruppe zeigte zwar weniger PPS während der ersten D-Phase, blieb jedoch auf diesem Niveau bis zum Ende der Testung (siehe Abbildung 7, Studie 3). Die unterschiedlichen Verhaltensmuster zeigten sich an Testtag 5 noch deutlicher: Die Kontrollgruppe wies weiterhin das initiale Sägezahnmuster auf, während die Läsionsgruppe ähnliche PPS zu allen 4 Phasen zeigte. Zusätzlich war ein möglicher Ermüdungseffekt in beiden Gruppen zu beobachten, da sich die PPS über den Verlauf einer Testung kontinuierlich verringerten. Am finalen Testtag wies die Läsionsgruppe ein ähnliches Sägezahnmuster wie die Kontrollgruppe auf. Eine Analyse der abgeschlossenen FR-13-Sequenzen während der ersten D-Phase über alle 10 Testtage zeigte, dass das Verhalten der Läsionsgruppe einer Glockenkurve entsprach, während die Kontrollgruppe eine konstante Anzahl an FR-13-Sequenzen abschloss (siehe Abbildung 8, Studie 3). Hingegen steigerte die Läsionsgruppe zuerst die Menge an abgeschlossenen Sequenzen bis Testtag 4, 5 und 6, um dann bis zum finalen Testtag auf eine ähnliche Menge an abgeschlossenen Sequenzen wie die Kontrollgruppe zu fallen.

Diskussion: Der Befund einer verbesserten Leistung im SRTT von Ratten mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus konnte auch mit der Verwendung einer pseudorandomisierten Stimulus-Präsentation bestätigt werden. Zusätzlich konnte nur eine verhältnismäßig geringe Steigerung der Leistung beobachtet werden, als auf eine sich wiederholende Stimulus-Präsentation gewechselt wurde. Dies könnte jedoch auf einen Deckeneffekt zurückzuführen sein. Da alle Versuchstiere in beiden Studien ihr Leistungsmaximum in einem vergleichbaren

Zeitraum wie in Studie 1 erreichten, ist zu vermuten, dass es sich bei der läsionsbedingten Leistungsverbesserung um einen allgemeinen Effekt des instrumentellen Lernens und nicht um einen spezifischen Effekt des sequenziellen Lernens handelte. Die Auswertung der Verhaltensabläufe während des SRTT-Trainings zeigte, dass die Läsionsgruppe nicht nur die Zeit verringerte, die die Tiere mit aufgabenbezogenen Verhaltensweisen verbrachten, sondern ebenfalls den Zeitaufwand für nicht-aufgabenbezogene Verhaltensweisen reduzierte. Zusätzlich konnte der Befund eines Defizits im Extinktionslernen bei Versuchstieren mit Läsionen des dorsalen Hippocampus erneut bestätigt werden. Die Ergebnisse der R-O-Dissoziations-Aufgabe deuteten auf ein weiteres Defizit der Läsionsgruppe hin: Während die Kontrollgruppe von Beginn der Testreihe an die wechselnden Anforderungen der Aufgabe erkennen konnte und die Ratten ihre Verhaltensabläufe entsprechend änderten, benötigte die Läsionsgruppe mehrere Tage, um ein ähnliches Verhaltensmuster zu zeigen. Bis Testtag 6 waren die Ratten mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus anscheinend nicht in der Lage zu erkennen, dass ihre Handlungen während der entkoppelten Phasen keine Auswirkungen auf den Erhalt der Futterbelohnung hatten, weshalb sie bis zu diesem Zeitpunkt eine konstant hohe Reaktionsfrequenz zeigten. Ein weiterer Interpretationsansatz dieser Beobachtung besteht darin, dass die Tiere mit einer dorsalen Hippocampus-Läsion zwar in der Lage waren die alternierenden R-O-Kontingenzen zu erkennen, jedoch die für das zielorientierte Verhalten notwendige Verhaltenskontrolle zu Gunsten des DLS, und somit dem *habit*-System, verschoben war.

Dieser Befund deutet zum einen auf ein Defizit in der Verhaltensflexibilität dieser Tiere hin, da diese deutlich mehr Zeit benötigten, um ihr Verhalten an die alternierenden R-O-Kontingenzen anzupassen. Zum anderen lässt sich das Verhalten der Läsionsgruppe als eine Präferenz für eine unterschiedliche Handlungsstrategie interpretieren: Durch den Verlust der hippocampalen Funktionen kam es zu einer Präferenz für das Lernen von Reiz-Reaktions-Mustern (S-R) bei den betroffenen Ratten. Da das Lernen von Reiz-Reaktions-Mustern in Verbindung mit *habit learning* und dem DLS gebracht wird, könnte die Läsion des dorsalen Hippocampus einen negativen Effekt auf die Verarbeitung von R-O-Assoziationen im DMS erzeugt haben. Eine Präferenz für das Lernen von S-R-Assoziationen hätte dann wiederum zu einer stärkeren bzw. schnelleren Bildung eines *habits* über den Verlauf des langen Trainingszeitraums geführt, was es den Tieren erschwerte, ihre Verhaltensabläufe bei einem plötzlichen Wechsel der Aufgabenbedingungen anzupassen. Diese Fähigkeit war jedoch nicht verloren, die Ratten der Läsionsgruppe benötigten aber deutlich länger als die Kontrollgruppe, um sich den veränderten Bedingungen anzupassen. Daten aus neuroanatomischen Studien bestätigen das Vorhandensein von ein- und ausgehenden Verbindungen zwischen Hippocampus und Striatum (Krayniak et al. 1981; Swanson und Köhler 1986; Groenewegen et al. 1987; McGeorge and Faull 1989), was auf eine gegenseitige Beeinflussung

hindeutet. Zusätzlich könnte es zu einer Veränderung der Informationsverarbeitung innerhalb des Hippocampus gekommen sein. Auch hier berichten neuroanatomische Studien von starken intrahippocampalen Verbindungen (Amaral und Witter 1989; Bast et al. 2009). Ebenso ist eine Interpretation im Rahmen der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie zulässig, wobei es durch den Verlust hippocampaler Verarbeitungsprozesse zu einer Verringerung der Konkurrenz bzw. Interferenz zwischen Hippocampus und Striatum kam. Diese Veränderung hätte dann eine Verschiebung der Verhaltensabläufe und Lernprozesse hin zu S-R-Assoziationen fördern können.

5. Allgemeine Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit konnte der Befund einer prozeduralen Leistungsverbesserung im Paradigma des SRTT nach der exzitotoxischen Läsion des dorsalen Hippocampus in drei unabhängig voneinander durchgeführten Studien repliziert werden. Zusätzlich war es möglich, ein Profil der damit einhergehenden Veränderungen der Verhaltensabläufe bei den betroffenen Versuchstieren zu erstellen.

Die Leistungsverbesserungen konnten bei der Einhaltung einer konstanten Lernmenge, im Gegensatz zur vorangegangenen Studie von Eckart et al. (2012), nicht mehr in den Variablen der Reaktionszeit und der Genauigkeit, sondern in denen der Versuchszeit und Nachverstärkungspause nachgewiesen werden (Studie 1). Es konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Leistungsverbesserungen auf der Ebene des instrumentellen Lernens stattfinden und nicht auf das sequenzielle Lernen beschränkt sind (Studie 2). Als Folge der Läsionen des dorsalen Hippocampus konnten Defizite im Extinktionslernen gezeigt werden (Studie 1 und 2). Neben den Unterschieden im aufgabenbezogenen Verhalten, konnte auch eine deutliche Reduzierung des nicht-aufgabenbezogenen Verhaltens bei den lädierten Tieren beobachtet werden (Studie 2). Weiterhin waren Einschränkungen in der Verhaltensflexibilität von Ratten mit Läsionen des dorsalen Hippocampus vorhanden. Diese Tiere benötigten signifikant länger, um ihr Verhalten an sich verändernde R-O-Kontingenzen anzupassen (Studie 3).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ursachen für die beobachteten Leistungsverbesserungen nicht zwangsläufig auf eine Stärkung von instrumentellen Lern- und Gedächtnisprozessen zurückzuführen sein müssen. Eine gleichwertige Interpretation stellt die Möglichkeit dar, dass die gezeigten Leistungsverbesserungen die Folge einer Reihe komplexer Veränderungen von Verhaltensabläufen sind und somit nur einen Nebeneffekt der eigentlichen Manipulation darstellen. Dass dieser Nebeneffekt in der vorliegenden Arbeit und der vorangegangenen Studie von Eckart et al. (2012) beobachtet werden konnte, wäre somit den speziellen Anforderungen des SRTT-Paradigmas geschuldet. Das bedeutet jedoch nicht, dass leistungsverbessernde Effekte von dorsalen Hippocampus-Läsionen nicht auch bei der Verwendung anderer instrumenteller Paradigmen auffindbar sind. Eine Vielzahl an

Publikationen stützt diese Vermutung (siehe z.B. Clark und Isaacson 1965; Means et al. 1970; Devenport und Holloway 1980; Packard et al. 1989, Schmelzeis und Mittleman 1996; Guillazo-Blanch et al. 2002; Compton et al. 2004; Kwok und Buckley 2009; Sanderson et al. 2012). Zusätzlich sind jedoch weitere systematische Untersuchungen anzuraten, da das Phänomen der Leistungsverbesserung nach der Hirnläsion in vielen Publikationen als unerwarteter Zufalls- oder Nebenfund bewertet wird. Stattdessen sollte in Betracht gezogen werden, dass dieser Befund eines von vielen möglichen Resultaten nach der Manipulation eines Netzwerks aus verschiedenen Gedächtnissystemen sein kann.

5.1. Limitationen der Arbeit

Da die erhobenen Daten aller drei Studien auf der Methode der exzitotoxischen Hirnläsion basieren, müssen die unvermeidlichen Einschränkungen dieses manipulativen Eingriffs bei der Interpretation der beobachteten Verhaltensveränderungen beachtet werden. Da sich der dorsale Hippocampus unterhalb des Neokortex befindet, ist eine Verletzung neokortikaler Regionen bei der Injektion der verwendeten Ibotensäure unumgänglich. Zusätzlich kann es durch die Diffusion des Neurotoxins zur ungewollten Zerstörung von an das Läsionsziel angrenzender Areale kommen. Auch lässt sich nicht feststellen, ob die beobachteten Effekte eine direkte Folge der Hirnläsion sind oder durch kompensatorische Mechanismen anderer, nicht betroffener Hirnareale zustande kommen. Ebenso können die betroffenen Versuchstiere Verhaltensabläufe ausbilden, die dem funktionellen Verlust eines Hirnareals entgegenwirken.

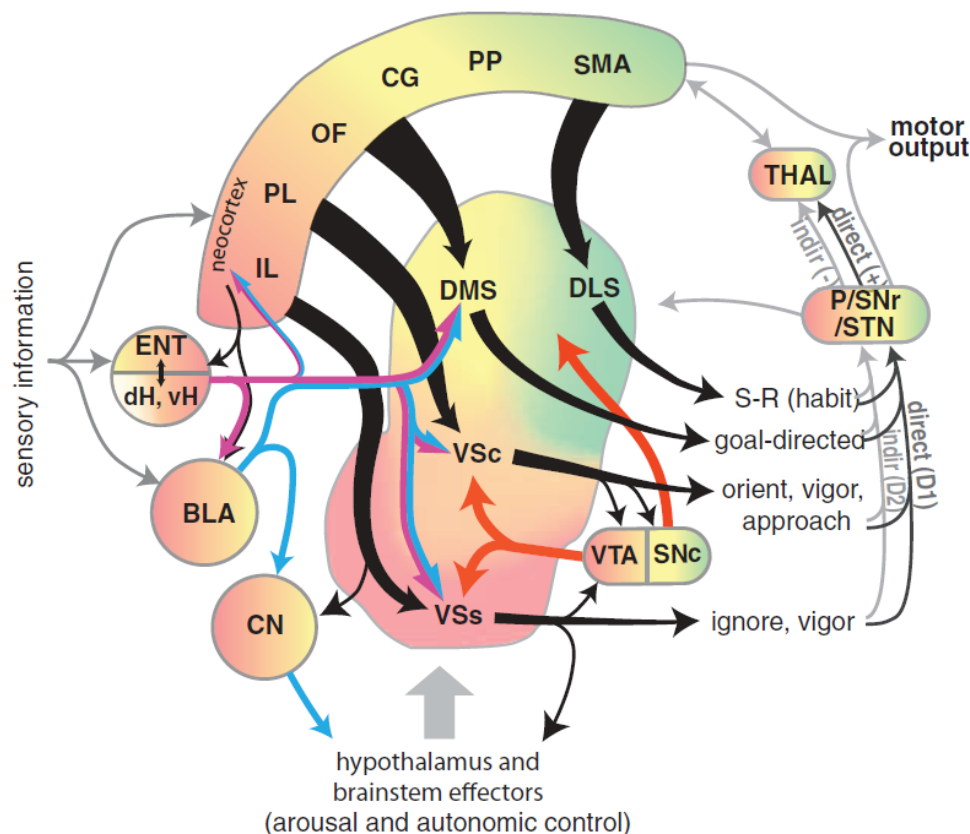
Die operativen Eingriffe stellen eine zusätzliche Quelle für unerwünschte Einflüsse auf die Versuchstiere dar. Um eine Kontrolle für diese Störfaktoren zu gewährleisten kamen schein-operierte Gruppen zum Einsatz. In der Literatur findet sich eine Vielzahl an Berichten über neurochemische und mnestiche Veränderungen, ausgelöst durch schein-operative Eingriffe (Adams et al. 1994; Raghavendra Rao et al. 2000; Grossman et al. 2003; Hirshler et al. 2010). Die eingesetzten schein-operierten Gruppen zeigten in Studie 1 und 2 eine schlechtere Leistung während des SRTT-Trainings, die sich in längeren Reaktionszeiten, Versuchszeiten und Nachverstärkungspausen ausdrückte. Da die operativen Prozeduren für Läsions- und schein-operierte Gruppen identisch waren und sich nur in der injizierten Substanz unterschieden (Ibotensäure vs. Kochsalzlösung), ist davon auszugehen, dass auch die Läsionsgruppe vergleichbare Defizite wie die schein-operierte Gruppe aufwies. Diese Defizite wurden jedoch durch den leistungssteigernden Effekt der dorsalen Hippocampus-Läsion überschattet. Warum die schein-operierten Gruppen in den zwei durchgeführten Studien, und auch bereits in der Studie von Eckart et al. (2012), schlechtere Leistungen im SRTT erzielten, lässt sich auf Basis der erhobenen Daten nicht abschließend klären. Die unklaren Ergebnisse der schein-operierten Gruppen aus Studie 1 und 2 führten daher zu der Entscheidung, auf eine schein-operierte Gruppe in Studie 3 zu verzichten.

Bei den durchgeführten Extinktionstests lässt sich nicht abschließend klären, ob das beobachtete Extinktionslernen ausschließlich durch die fehlende Futterbelohnung produziert wurde. Da die eingesetzten Futterspender bei jedem Einwurf eines Futterpellets ein eindeutiges Geräusch erzeugten, könnte auch das Ausbleiben dieser Geräusche durch die Abschaltung der Futterspender einen diskriminativen Hinweisreiz für die Versuchstiere dargestellt haben. Eine Interaktion zwischen ausbleibender Belohnung und fehlendem Futterspender-Geräusch ist daher möglich, weshalb diese Einschränkungen bei der Interpretation der Daten bedacht werden müssen.

5.2. Erklärungsansatz für die gefundenen Effekte

Die „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie bietet einen allgemeinen Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit gefundenen prozeduralen Leistungsverbesserungen nach der Läsion des dorsalen Hippocampus, dessen funktionelle Rolle primär dem episodischen Gedächtnissystem zugeschrieben wird. Die Betrachtung des Phänomens als Folge einer ausbleibenden Interferenz zwischen hippocampalen und striatalen Regionen ist zwar schlüssig, bleibt jedoch eine unspezifische und daher auch nur eine relativ oberflächliche Erklärung. Aus diesem Grund soll hier die Interaktion zwischen der Hippocampus-Formation und dem DMS sowie DLS näher beleuchtet werden, um dann einen weiteren Interpretationsansatz für die gefundenen Ergebnisse darlegen zu können.

Die Autoren Gruber und McDonald beschreiben in einem Übersichtsartikel aus dem Jahr 2012 ein Netzwerk aus verschiedenen Hirnarealen im Gehirn der Ratte, welches motivationale, bewusste und unbewusste Verhaltensabläufe kontrolliert und steuert (siehe Abbildung 5). Für das Striatum als zentrale Schnittstelle dieses Netzwerks postulieren sie drei funktionell getrennte Abschnitte: 1. Das dorsolaterale „Motor-Areal“, welches für die Steuerung komplexer Bewegungsabläufe und *habits* verantwortlich ist (egozentrisches Referenzsystem; S-R-Assoziationssystem). 2. Das dorsomediale „Kognitions-Areal“, welches Flexibilität in Bezug auf verschiedene Verhaltensstrategien und zielorientierte Verhaltensabläufe vermittelt (allozentrisches Referenzsystem, R-O-Assoziationssystem). 3. Das ventrale „limbische Areal“, welches den Kern und die Schalenregion des Nucleus accumbens einschließt und u.a. mit der Bewertung von Belohnung/Bestrafung, Kontextualisierung von sensorischen Informationen, sowie Pawlowscher Konditionierung in Verbindung gebracht wird. Diese drei Areale erhalten Projektionen aus dem Neokortex, der Hippocampus-Formation, der Amygdala und dem Hypothalamus. Auf die Verarbeitung der eingehenden Informationen folgt die Weitergabe an nachgeschaltete Strukturen wie Thalamus, Teilbereiche des Neokortex und der Substantia nigra. Die anschließende Informationsweitergabe erfolgt an das motorische System und resultiert letztendlich in dem Ausführen von Verhaltensabläufen.



associations	[S, C] - Oa	[S, C] - [R, O]	S-R
association description	Pavlovian	model-based	model-free
effector coordinate system	autonomic	allocentric	egocentric
effector domain	somatic	cognitive/skeletal	skeletal
relative association speed	rapid	fast	gradual
response domain	emotive/motivation	goals	habits
response type	orient, approach, vigor	action by inference	typical response

Abbildung 5: Modell des neuronalen Netzwerks von ausgewählten Verbindungen zwischen verschiedenen Hirnstrukturen, die Einfluss auf die Verhaltenskontrolle bei Nagetieren ausüben (aus Gruber und McDonald 2012). Vier anatomisch bzw. drei funktionell unterteilte Regionen des Striatum sind mit Abkürzungen und einem Farbgradienten markiert. Der Farbgradient kennzeichnet die zur Tabelle korrespondierenden, afferenten Projektionsbahnen (nach Voorn et al. 2004) und ein ähnlicher Farbgradient in unterschiedlichen Strukturen repräsentiert eine vergleichbare Topographie der Projektionsbahnen. Die zugespitzten Pfeile zeigen konvergenten Informationseingang in Abhängigkeit der Pfeildicke. Abkürzungen der Tabelle: Stimulus (S), Kontext (C), emotionale/motivationale Konsequenz (Oa), Reaktion (R), instrumentelle, zielorientierte Konsequenz (O). Abkürzungen des Schaubilds: Dorsolaterales Striatum (DLS), dorsomediales Striatum (DMS), Kern des Nucleus accumbens im ventralen Striatum (VSc), Schalenregion des Nucleus accumbens (VSs), ventrales Tegmentum (VTA), Substantia nigra pars compacta (SNc), Substantia nigra pars reticulata (SNr), Globus pallidus (P), subthalamischer Kern (STN), dorsaler Hippocampus (dH), ventraler Hippocampus (vH), entorhinaler Kortex (ENT), basolateraler Kern der Amygdala (BLA), zentraler Kern der Amygdala (CN), infralimbischer Kortex (IL), prälimbischer Kortex (PL), orbitofrontaler Kortex (OF), Gyrus cinguli (CG), parietaler Kortex (PP), somatomotorischer Kortex (SMA), Dopaminrezeptor (D1 und D2).

Die Hippocampus-Formation erhält in großem Umfang sensorische Informationen aus allen kortikalen Hirnarealen, die im Zusammenhang mit der sensorischen Informationsverarbeitung stehen (Lavenex und Amaral 2000; Witter und Amaral 2004). Diese Informationen werden über die perirhinalen und entorhinalen Kortex an die Hauptstruktur des Hippocampus weitergeleitet und dort entlang der septo-temporalen Achse verarbeitet (Bast und Feldon 2003; Bast et al. 2009). Der Informationsausgang erfolgt unterschiedlich entlang der septo-temporalen Achse: Der dorsale (septale) Hippocampus projiziert vorrangig in Strukturen des Temporallappens, wie Subiculum und entorhinaler Kortex, welche dann wiederum in neokor-

tikale (z.B. präfrontaler Kortex und Gyrus cinguli) und striatale Areale projizieren. So erhält das DMS indirekte Informationseingänge des dorsalen Hippocampus durch Projektionen des entorhinalen Kortex und den posterioren Gyrus cinguli (Sutherland et al. 1988; Lavenex und Amaral 2000; Cenquizca und Swanson 2007). Da der dorsale/intermediäre Hippocampus wichtige Funktionen bei der Verarbeitung kontextabhängiger sowie relationaler Informationen und Assoziationen übernimmt und über indirekte Projektionen mit dem DMS in Verbindung steht, ist zu vermuten, dass ein Verlust dorsaler Hippocampus-Funktionen einen negativen Einfluss auf die Informationsverarbeitung in Arealen des DMS hat.

Studien zeigen, dass der Hippocampus eine wichtige Rolle für die Verhaltensflexibilität spielt (z.B. bei *win-shift* Aufgaben: Packard und McGaugh 1996; Packard und Knowlton 2002) und sich die Frequenzen der neuronalen Erregungsmuster des Striatum und Hippocampus beim Lernen von prozeduralen Aufgaben angleichen bzw. synchronisieren (DeCoteau et al. 2007). Die Interaktion zwischen Hippocampus und DMS ist entscheidend für die Verarbeitung allozentrischer Orientierung und Wahrnehmung (McDonald und White 1994; Devan und White 1999; Packard 1999), sowie dem Erkennen von sich verändernden R-O-Kontingenzen (Lex und Hauber 2010). Im Gegenzug konkurrieren das allozentrische System aus Hippocampus und DMS und das egozentrische DLS-System um die Verhaltenskontrolle (Gruber und McDonald 2012), weshalb auch hier ein Interferenz-Effekt zu erwarten ist.

Das in dieser Arbeit verwendete Paradigma des SRTT verlangt primär prozedurale Gedächtnisleistungen und das Verhalten der Versuchstiere wird besonders während der Shaping- und zu Beginn der Trainingsphase durch R-O-Assoziationen vermittelt. Wie jedoch bereits gezeigt werden konnte, ist im Verlauf einer andauernden Trainingsphase eine Verlagerung der Verhaltenskontrolle auf S-R-Assoziationen und somit auf das *habit*-System bzw. auf das DLS zu erwarten (Graybiel 2008). Eine solche Verlagerung würde sich in einer Reduktion der Verhaltensflexibilität und einer erhöhten Extinktionsresistenz ausdrücken. Zusätzlich sollte allozentrisches Verhalten, d.h. basierend auf externen Veränderungen (z.B. der Umgebung oder von diskriminativen Hinweisreizen), mit zunehmender Verhaltenskontrolle durch das DLS, eine untergeordnete Rolle gegenüber egozentrischem Verhalten spielen. Zielgerichtetes Lernen und Verhalten, welches vom Wert einer Belohnung abhängig ist, würde somit einen geringeren Anteil an der Kontrolle des ausgeführten Verhaltens haben.

In diesem funktionellen und anatomischen Netzwerk aus Hippocampus-Formation, Neokortex und DMS übernimmt der dorsale Teil des Hippocampus möglicherweise die Rolle eines Signalgebers für bisher unbekannte Informationen oder Informationen über Veränderungen der Umwelt und ist für die Kontextualisierung dieser Informationen verantwortlich. Diese Informationen werden an neokortikale und striatale Areale weitervermittelt und sind entscheidend für die allozentrische Orientierung und Wahrnehmung der Ratte. Fehlen diese

Informationen bzw. existiert ein funktionelles Defizit in der Hippocampus-Formation, kommt es zu einer beschleunigten Übertragung der Verhaltenskontrolle an das DLS und damit zu einer stärkeren und früheren Ausbildung eines *habits* bei andauerndem, instrumentellem Training. Wenn es durch die Schädigung des dorsalen Hippocampus bei den Versuchstieren dieser Arbeit zu einer stärkeren und früheren Ausbildung eines *habits* gekommen ist, würde dies erklären, warum die Ratten der jeweiligen Experimentalgruppen eine höhere Extinktionsresistenz – mit und ohne Devaluation der Futterbelohnung – zeigten und sich nur deutlich verzögert verändernden R-O-Kontingenzen anpassen konnten. Die Tiere der Läsionsgruppe waren jedoch sowohl in der Lage, die Anforderungen des SRTT durch initiale R-O-Assoziationen zu lernen, als auch nach einer andauernden Konfrontation mit stetig wechselnden Kontingenzen zwischen Reaktion und Konsequenz ihr Verhalten anzupassen. Der Verlust dorsaler Hippocampus-Funktionen reduzierte also die Sensitivität der Versuchstiere gegenüber Situationen, in denen unterschiedliche Verhaltensstrategien vorteilhaft wären, lies aber die eigentliche Funktionalität des DMS intakt.

Zusätzlich könnte eine Reduzierung der allozentrischen Orientierung und Wahrnehmung erklären, warum Ratten mit einer Läsion des dorsalen Hippocampus nach andauerndem Training ihr nicht-aufgabenbezogenes Verhalten reduzierten. Das Putzverhalten von Ratten wird primär von Neuronen des DLS gesteuert (Aldrige und Berridge 1998) und Veränderungen des dopaminergen Systems können die Intensität des Putzverhaltens modulieren (Berridge et al. 2005). Eine Verschiebung der Verhaltenskontrolle auf das DLS könnte auch eine Anpassung der Dopamin-bedingten Signaltransduktion nach sich ziehen, welche sich dann in Veränderungen der Art oder der Häufigkeit des Auftretens von inhärenten Verhaltensweisen wie Aufrichte-, Schnüffel- oder Putzverhalten ausdrücken könnte.

Die identischen Reaktionszeiten und Genauigkeiten von Kontroll- und Läsionsgruppen im späteren Verlauf des SRTT-Trainings lassen im Zusammenhang mit den gleichzeitig reduzierten Versuchszeiten und Nachverstärkungspausen der Läsionsgruppen den Schluss zu, dass die beobachteten Leistungsverbesserungen primär ein Resultat von Läsionsbedingten Veränderungen von Verhaltensabläufen und nicht von einer eigentlichen Verbesserungen der Lernprozesse war. Verhaltensabläufe, welche stärker der Kontrolle des *habit*-Systems unterliegen, erzeugten für die betroffenen Ratten offenbar einen Vorteil im Rahmen der Anforderungen des SRTT.

5.3. Ausblick

Aufgrund der dreimaligen Replikation des Befundes einer prozeduralen Leistungsverbesserung nach der Läsion des dorsalen Hippocampus, wie er in der Studie von Eckart et al. (2012) gezeigt wurde, kann von einem nachweislich gesicherten Effekt ausgegangen werden. Inwiefern dieser Effekt jedoch in anderen instrumentellen Lern- und Gedächtnisaufgaben als dem SRTT auffindbar ist und welcher kausale Zusammenhang zwischen der proze-

duralen Leistungsverbesserung und dem funktionellen Verlust des dorsalen Hippocampus besteht, bleiben weiterhin offene Fragen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich folgende Ansätze für zukünftige Untersuchungen:

- Um die Frage zu klären, ob eine Läsion des dorsalen Hippocampus primär einen Effekt auf die eigentlichen Lernprozesse, auf das Abrufen der Lerninhalte oder auf die Veränderungen von Verhaltensabläufen hat, die sich im Kontext des SRTT als vorteilhaft erweisen, sollten die Zeitpunkte der Hirnläsion variiert werden. Eine Läsion könnte z.B. erst nach Abschluss des SRTT-Trainings vorgenommen werden. Eine anschließende Veränderung der Leistung im SRTT könnte dann nicht auf einen Effekt in Bezug auf die eigentlichen Lernprozesse zurückzuführen sein. Läsionen nach der Shaping- und vor der Trainingsphase oder Läsionen zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Trainingsphase könnten ebenfalls weitere Erklärungen für die Ursachen der beobachteten Leistungsverbesserungen und Verhaltensveränderungen liefern. Eine zeitlich begrenzte, pharmakologische Deaktivierung des Hippocampus, ggf. durch den Einsatz optogenetischer Verfahren, zu verschiedenen Zeitpunkten der Trainingsperiode ist zusätzlich zu empfehlen, da sich so die Möglichkeiten der Datenerhebung flexibler gestalten lassen. Auch ließen sich hiermit einige läsions-spezifische Artefaktquellen ausschließen.
- Die Rolle neokortikaler Areale sollte zusätzlich untersucht werden. Unter der Annahme, dass die von der „Multiple Parallel Memory Systems“-Theorie postulierten Interaktionen oder Interferenzen zwischen verschiedenen Gedächtnissystemen auf der Ebene des Neokortex (wie z.B. präfrontaler Kortex oder Gyrus cinguli) korrekt sind, müssten sich vergleichbare Leistungsverbesserungen finden lassen, wenn Faserverbindungen vom dorsalen Hippocampus oder angrenzenden Arealen zu Strukturen des Neokortex permanent oder temporär ausgeschaltet werden.
- Weitere Verhaltensuntersuchungen an Versuchstieren mit dorsalen Hippocampus-Läsionen sind anzuraten, vor allem nach einem fortgeschrittenen, instrumentellen Training. Die erhobenen Verhaltensdaten aus Studie 2 deuten auf signifikante Veränderungen des nicht-aufgabenbezogenen Verhaltens nach andauerndem Training im SRTT hin, welche möglicherweise mit einer stärkeren Tendenz zur Ausbildung von *habits* bei Versuchstieren mit dorsalen Hippocampus-Läsionen zusammenhängen.
- Zusätzlich sollten neurophysiologische Veränderungen des DMS und DLS nach andauerndem SRTT-Training analysiert werden. Hierzu könnten histologische und elektrophysiologische Messmethoden in Betracht gezogen werden. Mögliche Befunde wären z.B. Veränderungen neuronaler Erregungsmuster oder der Dopaminbedingten Signaltransduktion.

5.4. Fazit

Mit der vorliegenden Arbeit konnte der Befund einer prozeduralen Leistungsverbesserung nach der exzitotoxischen Läsion des dorsalen Hippocampus repliziert und gefestigt werden. Im Zusammenhang mit diesen Resultaten konnte außerdem ein verändertes Verhaltensprofil der betroffenen Ratten aufgezeigt werden, welches auf eine Verschiebung der Verhaltenskontrolle innerhalb des Striatum hinweist. Auf Basis dieser empirischen Befunde können weitere Ansätze verfolgt werden, um die Interaktionen zwischen hippocampalen, striatalen und neokortikalen Arealen umfassender zu untersuchen. Der Fokus zukünftiger Studien sollte hierbei nicht nur auf beobachtbaren Verhaltensveränderungen nach einer Hirnläsion liegen, sondern auch die Möglichkeit morphologischer und physiologischer Anpassungen in angrenzenden Hirnstrukturen in Betracht ziehen und untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

[A]

- Adams, F. S., Schwarting, R. K., and Huston, J. P. (1994). Behavioral and neurochemical asymmetries following unilateral trephination of the rat skull: is this control operation always appropriate? *Physiology & Behavior* 55, 947–952.
- Aldridge, J. W., and Berridge, K. C. (1998). Coding of serial order by neostriatal neurons: a "natural action" approach to movement sequence. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18, 2777–2787.
- Allen, W. F. (1940). Effect of ablating the frontal lobes, hippocampi and occipito-parietotemporal (excepting piriform areas) lobes on positive and negative olfactory conditioned reflexes. *American Journal of Physiology* 128, 754–771.
- Amaral, D. G., and Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591. doi: 10.1016/0306-4522(89)90424-7
- Amaral D. G, and Lavenex P. "Hippocampal neuroanatomy," in *The Hippocampus Book*, eds P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, and J. O'Keefe Oxford University Press, 37-114.

[B]

- Balleine, B. W., Killcross, A. S., and Dickinson, A. (2003). The effect of lesions of the basolateral amygdala on instrumental conditioning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 666–675.
- Bast, T. (2011). The hippocampal learning-behavior translation and the functional significance of hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology* 21, 492–501. doi: 10.1016/j.conb.2011.01.003
- Bast, T., and Feldon, J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Progress in Neurobiology* 70, 319–345.
- Bast, T., Wilson, I. A., Witter, M. P., and Morris, R. G. M. (2009). From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biology* 7, e1000089. doi: 10.1371/journal.pbio.1000089
- Berger, K., Przedborski, S., and Cadet, J. L. (1991). Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Research Bulletin* 26, 301–307.
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., and Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology* 3, 4. doi: 10.1186/1741-7007-3-4
- Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G., and Armentero, M. T. (2007). Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *The European Journal of Neuroscience* 25, 397–405. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05285.x
- Blundell, P., Hall, G., and Killcross, S. (2001). Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21, 9018–9026.
- Bohbot, V. D., Jech, R., Ruzicka, E., Nadel, L., Kalina, M., Stepankova, K., et al. (2002). Rat spatial memory tasks adapted for humans: characterization in subjects with intact brain

and subjects with selective medial temporal lobe thermal lesions. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 51 (1), 49-65.

Braun, S., and Hauber, W. (2011). The dorsomedial striatum mediates flexible choice behavior in spatial tasks. *Behavioural Brain Research* 220, 288–293. doi: 10.1016/j.bbr.2011.02.008

Braun, S., and Hauber, W. (2012). Striatal dopamine depletion in rats produces variable effects on contingency detection: task-related influences. *The European Journal of Neuroscience* 35, 486–495. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07969.x

Breen, R. A., and McGaugh, J. L. (1961). Facilitation of maze learning with posttrial injections of picrotoxin. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 54, 498–501. doi: 10.1037/h0046436

Brown, T. S., Kaufmann, P. G., and Marco, L. A. (1969). The hippocampus and response perseveration in the cat. *Brain Research* 12, 86–98. doi: 10.1016/0006-8993(69)90057-2

Bruin, J. de, Swinkels, W., and Brabander, J. M. de (1997). Response learning of rats in a Morris water maze: Involvement of the medial prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research* 85, 47–55. doi: 10.1016/S0166-4328(96)00163-5

[C]

Cameron, H. A., and Glover, L. R. (2015). Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annual Review of Psychology* 66, 53–81. doi: 10.1146/annurev-psych-010814-015006

Cenquizca, L. A., and Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Research Reviews* 56, 1–26. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.002

Chen, L. Y., Rex, C. S., Pham, D. T., Lynch, G., and Gall, C. M. (2010). BDNF signaling during learning is regionally differentiated within hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30, 15097–15101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3549-10.2010

Cheung, T. H. C., and Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience* 6, 36. doi: 10.1186/1471-2202-6-36

Chudasama, Y., Izquierdo, A., and Murray, E. A. (2009). Distinct contributions of the amygdala and hippocampus to fear expression. *The European Journal of Neuroscience* 30, 2327–2337. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.07012.x

Chudasama, Y., Wright, K. S., and Murray, E. A. (2008). Hippocampal lesions in rhesus monkeys disrupt emotional responses but not reinforcer devaluation effects. *Biological Psychiatry* 63, 1084–1091. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.11.012

Clark, C. V. H., and Isaacson, R. L. (1965). Effect of bilateral hippocampal ablation on DRL performance. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 59, 137–140. doi: 10.1037/h0021599

Clark, R. E., and Squire, L. R. (2010). An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia* 48, 2234–2244. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2010.02.004

Clayton, N. S., and Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395, 272–274. doi: 10.1038/26216

Cohen, A., Ivry, R. I., and Keele, S. W. (1990). Attention and structure in sequence learning. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 16, 17–30. doi: 10.1037/0278-7393.16.1.17

- Colwill, R. M., and Rescorla, R. A. (1985). Instrumental responding remains sensitive to reinforcer devaluation after extensive training. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 11, 520–536. doi: 10.1037/0097-7403.11.4.520
- Compton, D. M. (2004). Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behavioural Processes* 67, 335–342. doi: 10.1016/j.beproc.2004.06.002
- Coover, G. D., Goldman, L., and Levine, S. (1971). Plasma corticosterone levels during extinction of a lever-press response in hippocampectomized rats. *Physiology & Behavior* 7, 727–732.
- Corbit, L. H., and Balleine, B. W. (2005). Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general and outcome-specific forms of pavlovian-instrumental transfer. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, 962–970. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4507-04.2005
- Corbit, L. H., and Janak, P. H. (2007). Inactivation of the lateral but not medial dorsal striatum eliminates the excitatory impact of Pavlovian stimuli on instrumental responding. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 13977–13981. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4097-07.2007
- Coutureau, E., and Killcross, S. (2003). Inactivation of the infralimbic prefrontal cortex reinstates goal-directed responding in overtrained rats. *Behavioural Brain Research* 146, 167–174. doi: 10.1016/j.bbr.2003.09.025
- Crossman, E. K. (1968). Pause relationships in multiple and chained fixed-ratio schedules. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 11, 117–126. doi: 10.1901/jeab.1968.11-117
- [D]**
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E. C., Dombrowski, P., Bortolanza, M., Santos, L. M., Boschen, S. L., et al. (2009). Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. *Behavioural Brain Research* 199, 157–170. doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.001
- DeCoteau, W. E., Thorn, C., Gibson, D. J., Courtemanche, R., Mitra, P., Kubota, Y., et al. (2007). Learning-related coordination of striatal and hippocampal theta rhythms during acquisition of a procedural maze task. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5644–5649. doi: 10.1073/pnas.0700818104
- Deroost, N., Zeischka, P., Coomans, D., Bouazza, S., Depessemier, P., and Soetens, E. (2010). Intact first- and second-order implicit sequence learning in secondary-school-aged children with developmental dyslexia. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 32, 561–572. doi: 10.1080/13803390903313556
- Desmedt, A., Marighetto, A., Garcia, R., and Jaffard, R. (2003). The effects of ibotenic hippocampal lesions on discriminative fear conditioning to context in mice: impairment or facilitation depending on the associative value of a phasic explicit cue. *The European Journal of Neuroscience* 17, 1953–1963.
- Devan, B. D., and White, N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 2789–2798.
- Devenport, L. D., and Holloway, F. A. (1980). The rat's resistance to superstition: role of the hippocampus. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 94, 691–705.
- Dickinson, A., Balleine, B., Watt, A., Gonzalez, F., and Boakes, R. A. (1995). Motivational control after extended instrumental training. *Animal Learning & Behavior* 23, 197–206. doi: 10.3758/BF03199935

Domenger, D., and Schwarting, R. K. W. (2005). Sequential behavior in the rat: a new model using food-reinforced instrumental behavior. *Behavioural Brain Research* 160, 197–207. doi: 10.1016/j.bbr.2004.12.002

Domenger, D., and Schwarting, R. K. W. (2006). The serial reaction time task in the rat: effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists. *Behavioural Brain Research* 175, 212–222. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.027

Domenger, D., and Schwarting, R. K. W. (2007). Sequential behavior in the rat: role of skill and attention. *Experimental Brain Research* 182, 223–231. doi: 10.1007/s00221-007-0987-z

Domenger, D., and Schwarting, R. K. W. (2008). Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on performance in a rat sequential reaction time task. *Neuroscience Letters* 444, 212–216. doi: 10.1016/j.neulet.2008.08.048

[E]

Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., and Schwarting, R. K. W. (2012). Dorsal hippocampal lesions boost performance in the rat sequential reaction time task. *Hippocampus* 22, 1202–1214. doi: 10.1002/hipo.20965

Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., McDonald, R. S., and Schwarting, R. K.-W. (2010). 6-hydroxydopamine lesions in the rat neostriatum impair sequential learning in a serial reaction time task. *Neurotoxicity Research* 17, 287–298. doi: 10.1007/s12640-009-9103-4

Ehrlich, A. (1963). Effects of tegmental lesions on motivated behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 390–396.

Ennaceur, A., Neave, N., and Aggleton, J. P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental Brain Research* 113, 509–519.

[F]

Ferster, C. B., and Skinner, B. F. (1957). Schedules of reinforcement. East Norwalk, CT, US: *Appleton-Century-Crofts*.

Fornaguera, J., Carey, R. J., Dai, H., Huston, J. P., and Schwarting, R. K. W. (1994). Differentiation of motor inactivation from movement asymmetry effects in an animal model of hemi-parkinsonism. *Neuroreport* 6, 173–176.

Fornaguera, J., and Schwarting, R. K. (1999). Early behavioral changes after nigro-striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 23, 1353–1368.

[G]

Gallagher, M., and Holland, P. C. (1992). Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus* 2, 81–88. doi: 10.1002/hipo.450020111

Gluck, M. A., Mercado, E., and Myers, C. E. (2014). Learning and Memory: From Brain to Behavior. New York, NY: *Worth Publishers*.

Goldstein, L. E., Rasmusson, A. M., Bunney, B. S., and Roth, R. H. (1996). Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16, 4787–4798.

Gray, J. A., and McNaughton, N. (2003). Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System. Oxford: *Oxford University Press* UK.

- Graybiel, A. M. (1998). The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiology of Learning and Memory* 70, 119–136. doi: 10.1006/nlme.1998.3843
- Graybiel, A. M. (2008). Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annual Review of Neuroscience* 31, 359–387. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851
- Grenn, R. H., Beatty, W. W., and Schwartzbaum, J. S. (1967). Comparative Effects Of Septo-Hippocampal And Caudate Lesions On Avoidance Behavior In Rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 64, 444–452. doi: 10.1037/h0025195
- Groenewegen, H. J., der Zee, E. V.-V., te Kortschot, A., and Witter, M. P. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 23, 103–120. doi: 10.1016/0306-4522(87)90275-2
- Grossman, R., Shohami, E., Alexandrovich, A., Yatsiv, I., Kloog, Y., and Biegon, A. (2003). Increase in peripheral benzodiazepine receptors and loss of glutamate NMDA receptors in a mouse model of closed head injury: a quantitative autoradiographic study. *NeuroImage* 20, 1971–1981.
- Gruart, A., Munoz, M. D., and Delgado-Garcia, J. M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, 1077–1087. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006
- Gruber, A. J., and McDonald, R. J. (2012). Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6, 50. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00050
- Guillazo-Blanch, G., Nadal, R., Vale-Martinez, A., Marti-Nicolovius, M., Arevalo, R., and Morgado-Bernal, I. (2002). Effects of fimbria lesions on trace two-way active avoidance acquisition and retention in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 78, 406–425.

[H]

- Hirsh, R. (1974). The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: A theory. *Behavioral Biology* 12, 421–444. doi: 10.1016/S0091-6773(74)92231-7
- Hirshler, Y. K., Polat, U., and Biegon, A. (2010). Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Experimental Neurology* 222, 42–50. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.12.006
- Hopkins, R. O., Waldram, K., and Kesner, R. P. (2004). Sequences assessed by declarative and procedural tests of memory in amnesic patients with hippocampal damage. *Neuropsychologia* 42, 1877–1886. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2004.05.008
- Hoz, L. de, Knox, J., and Morris, R. G. M. (2003). Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus* 13, 587–603. doi: 10.1002/hipo.10079
- Hoz, L. de, Martin, S. J., and Morris, R. G. M. (2004). Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory. *PLoS Biology* 2, E225. doi: 10.1371/journal.pbio.0020225

[I]

- Isaacson, R. L., and Kimble, D. P. (1972). Lesions of the limbic system: their effects upon hypotheses and frustration. *Behavioral Biology* 7, 767–793.
- Isaacson, R. L., Douglas, R. J., and Moore, R. Y. (1961). The effect of radical hippocampal ablation on acquisition of avoidance response. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 54, 625–628. doi: 10.1037/h0047286

Ito, R., Everitt, B. J., and Robbins, T. W. (2005). The hippocampus and appetitive Pavlovian conditioning: effects of excitotoxic hippocampal lesions on conditioned locomotor activity and autoshaping. *Hippocampus* 15, 713–721. doi: 10.1002/hipo.20094

[J]

Jacoby, L. L. (1999). Ironic effects of repetition: measuring age-related differences in memory. *Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition* 25, 3–22.

Jaldow, E. J., Oakley, D. A., and Davey, G. C. (1989). Performance of Decorticated Rats on Fixed Interval and Fixed Time Schedules. *The European Journal of Neuroscience* 1, 461–470.

[K]

Killcross, S., and Coutureau, E. (2003). Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cerebral Cortex* 13, 400–408.

Kimble, D. P. (1968). Hippocampus and internal inhibition. *Psychological Bulletin* 70, 285–295.

King, F. A. (1958). Effects of septal and amygdaloid lesions on emotional behavior and conditioned avoidance responses in the rat. *Journal of Nervous & Mental Disease* 126, 57–63.

Kinoshita, S. (1995). The word frequency effect in recognition memory versus repetition priming. *Memory & Cognition* 23, 569–580.

Klüver, H. (1965). Neurobiology of normal and abnormal perception. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Psychopathological Association* 53, 1–40.

Knowlton, B. J., Mangels, J. A., and Squire, L. R. (1996). A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 273, 1399–1402.

Knowlton, B. J., and Squire, L. R. (1995). Remembering and knowing: two different expressions of declarative memory. *Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition* 21, 699–710.

Krayniak, P. F., Meibach, R. C., and Siegel, A. (1981). A projection from the entorhinal cortex to the nucleus accumbens in the rat. *Brain Research* 209, 427–431. doi: 10.1016/0006-8993(81)90165-7

Kwok, S. C., and Buckley, M. J. (2009). Fornix transected macaques make fewer perseverative errors than controls during the early stages of learning conditional visuovisual discriminations corrected. *Behavioural Brain Research* 205, 207–213. doi: 10.1016/j.bbr.2009.08.016

[L]

Lang, A. E., and Lozano, A. M. (1998a). Parkinson's disease. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 339, 1044–1053. doi: 10.1056/NEJM199810083391506

Lang, A. E., and Lozano, A. M. (1998b). Parkinson's disease. Second of two parts. *The New England Journal of Medicine* 339, 1130–1143. doi: 10.1056/NEJM199810153391607

Lashley, K. S. (1920). Studies of cerebral function in learning. *Psychobiology* 2, 55–135. doi: 10.1037/h0071866

Lavenex, P., and Amaral, D. G. (2000). Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus* 10, 420–430. doi: 10.1002/1098-1063(2000)10:4<420:AID-HIPO8>3.0.CO;2-5

LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., and Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned

fear. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 8, 2517–2529.

Lee, H., and Kim, J. J. (1998). Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18, 8444–8454.

Lee, T., and Kim, J. J. (2004). Differential effects of cerebellar, amygdalar, and hippocampal lesions on classical eyeblink conditioning in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, 3242–3250. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5382-03.2004

Lex, B., and Hauber, W. (2010). Disconnection of the entorhinal cortex and dorsomedial striatum impairs the sensitivity to instrumental contingency degradation. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35, 1788–1796. doi: 10.1038/npp.2010.46

[M]

Machado, C. J., and Bachevalier, J. (2008). Behavioral and hormonal reactivity to threat: effects of selective amygdala, hippocampal or orbital frontal lesions in monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 33, 926–941. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.04.012

Martin, J. H. (2003). *Neuroanatomy: Text and Atlas*. New York, NY: McGraw-Hill.

Mazur, J. E. (2014). *Learning and Behavior*. Harlow, Essex: Pearson.

McDonald, R. J., and White, N. M. (1994). Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behavioral and Neural Biology* 61, 260–270.

McDonald, R. J., Foong, N., and Hong, N. S. (2004). Incidental information acquired by the amygdala during acquisition of a stimulus-response habit task. *Experimental Brain Research* 159, 72–83. doi: 10.1007/s00221-004-1934-x

McDonald, R. J., King, A. L., Wasiak, T. D., Zelinski, E. L., and Hong, N. S. (2007). A complex associative structure formed in the mammalian brain during acquisition of a simple visual discrimination task: dorsolateral striatum, amygdala, and hippocampus. *Hippocampus* 17, 759–774. doi: 10.1002/hipo.20333

McDonald, R. J., and White, N. M. (2013). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience* 127, 835–853. doi: 10.1037/a0034883

McGaugh, J. L. (1966). Time-Dependent Processes in Memory Storage. *Science* 153, 1351–1358. doi: 10.1126/science.153.3742.1351

McGeorge, A. J., and Faull, R. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29, 503–537. doi: 10.1016/0306-4522(89)90128-0

McHugh, S. B., Fillenz, M., Lowry, J. P., Rawlins, J. N. P., and Bannerman, D. M. (2011). Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. *The European Journal of Neuroscience* 33, 322–337. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07497.x

McHugh, T. J., and Tonegawa, S. (2009). CA3 NMDA receptors are required for the rapid formation of a salient contextual representation. *Hippocampus* 19, 1153–1158. doi: 10.1002/hipo.20684

Means, L. W., Walker, D. W., and Isaacson, R. L. (1970). Facilitated single-alternation go, no-go acquisition following hippocampectomy in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 72, 278–285. doi: 10.1037/h0029459

Mintz, D. E., Mourer, D. J., and Gofseyeff, M. (1967). Sequential effects in fixed-ratio postreinforcement pause duration. *Psychonomic Science* 9, 387–388. doi: 10.3758/BF03330859

Mogenson, G. J., Jones, D. L., and Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology* 14, 69–97.

[N]

Nagy, H., Keri, S., Myers, C. E., Benedek, G., Shohamy, D., and Gluck, M. A. (2007). Cognitive sequence learning in Parkinson's disease and amnesic mild cognitive impairment: Dissociation between sequential and non-sequential learning of associations. *Neuropsychologia* 45, 1386–1392. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2006.10.017

Nissen, M. J., and Bullemer, P. (1987). Attentional requirements of learning: Evidence from performance measures. *Cognitive Psychology* 19, 1–32. doi: 10.1016/0010-0285(87)90002-8

[O]

Okaichi, H. (1987). Performance and dominant strategies on place and cue tasks following hippocampal lesions in rats. *Psychobiology* 15, 58–63. doi: 10.3758/BF03327264

O'Keefe, J., and Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford: *Clarendon Press*.

Olton, D. S., and Isaacson, R. L. (1968). Hippocampal lesions and active avoidance. *Physiology & Behavior* 3, 719–724. doi: 10.1016/0031-9384(68)90142-X

[P]

Packard, M. G. (1999). Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 12881–12886. doi: 10.1073/pnas.96.22.12881

Packard, M. G., Hirsh, R., and White, N. M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 9, 1465–1472.

Packard, M. G., and McGaugh, J. L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 65, 65–72. doi: 10.1006/nlme.1996.0007

Packard, M. G., and Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience* 25, 563–593. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937

Packard, M. G., and McGaugh, J. L. (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. *Behavioral Neuroscience* 106, 439–446. doi: 10.1037/0735-7044.106.3.439

Packard, M. G., and Teather, L. A. (1997). Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behavioral Neuroscience* 111, 543–551. doi: 10.1037/0735-7044.111.3.543

Packard, M. G., and White, N. M. (1991). Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behavioral Neuroscience* 105, 295–306. doi: 10.1037/0735-7044.105.2.295

Peleg-Raibstein, D., Yee, B. K., Feldon, J., and Hauser, J. (2009). The amphetamine sensitization model of schizophrenia: relevance beyond psychotic symptoms? *Psychopharmacology* 206, 603–621. doi: 10.1007/s00213-009-1514-7

Pouzet, B., Veenman, C., Yee, B., Feldon, J., and Weiner, I. (1999). The effects of radiofrequency lesion or transection of the fimbria–fornix on latent inhibition in the rat. *Neuroscience* 91, 1355–1368. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00691-5

[R]

Raghavendra Rao, V. L., Dogan, A., Bowen, K. K., and Dempsey, R. J. (2000). Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Experimental Neurology* 161, 102–114. doi: 10.1006/exnr.1999.7269

Ragozzino, M. E., Detrick, S., and Kesner, R. P. (1999). Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 4585–4594.

Rajaram, S. (1996). Perceptual effects on remembering: recollective processes in picture recognition memory. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 22, 365–377.

Rawlins, J. N., Feldon, J., and Gray, J. A. (1980). The effects of hippocampectomy and of fimbria section upon the partial reinforcement extinction effect in rats. *Experimental Brain Research* 38, 273–283.

Reber, P. J., and Squire, L. R. (1994). Parallel brain systems for learning with and without awareness. *Learning & Memory* 1, 217–229.

Reed, J., and Johnson, P. (1994). Assessing implicit learning with indirect tests: Determining what is learned about sequence structure. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 20, 585–594. doi: 10.1037/0278-7393.20.3.585

Rich, E. L., and Shapiro, M. L. (2007). Prelimbic/infralimbic inactivation impairs memory for multiple task switches, but not flexible selection of familiar tasks. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 4747–4755. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0369-07.2007

Rudy, J. W., Huff, N. C., and Matus-Amat, P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28, 675–685. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.09.004

[S]

Sage, J. R., and Knowlton, B. J. (2000). Effects of US devaluation on win-stay and win-shift radial maze performance in rats. *Behavioral Neuroscience* 114, 295–306.

Sanderson, D. J., Rawlins, J. N. P., Deacon, R. M. J., Cunningham, C., Barkus, C., and Bannerman, D. M. (2012). Hippocampal lesions can enhance discrimination learning despite normal sensitivity to interference from incidental information. *Hippocampus* 22, 1553–1566. doi: 10.1002/hipo.20995

Schmaltz, L. W., and Theios, J. (1972). Acquisition and extinction of a classically conditioned response in hippocampectomized rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 79, 328–333.

Schmaltz, L. W., and Isaacson, R. L. (1966). The effects of preliminary training conditions upon DRL performance in the hippocampectomized rat. *Physiology & Behavior* 1, 175–182. doi: 10.1016/0031-9384(66)90065-5

- Schmelzeis, M. C., and Mittleman, G. (1996). The hippocampus and reward: effects of hippocampal lesions on progressive-ratio responding. *Behavioral Neuroscience* 110, 1049–1066.
- Schroeder, J. P., Wingard, J. C., and Packard, M. G. (2002). Post-training reversible inactivation of hippocampus reveals interference between memory systems. *Hippocampus* 12, 280–284. doi: 10.1002/hipo.10024
- Schwabe, K., Klein, S., and Koch, M. (2006). Behavioural effects of neonatal lesions of the medial prefrontal cortex and subchronic pubertal treatment with phencyclidine of adult rats. *Behavioural Brain Research* 168, 150–160. doi: 10.1016/j.bbr.2005.11.005
- Scoville, W. B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20, 11–21.
- Simonov, P. V. (1974). On the role of the hippocampus in the integrative activity of the brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 34, 33–41.
- Simonov, P. V. (1991). Thwarted action needed—informational theories of emotions. *International Journal of Comparative Psychology* 5, 103–107.
- Squire, L. R. (1992). Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. *Journal of Cognitive Neuroscience* 4, 232–243. doi: 10.1162/jocn.1992.4.3.232
- Squire, L. R. (1987). *Memory and brain*. New York, NY: Oxford University Press.
- Stefanacci, L., Buffalo, E. A., Schmolck, H., and Squire, L. R. (2000). Profound amnesia after damage to the medial temporal lobe: A neuroanatomical and neuropsychological profile of patient E. P. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, 7024–7036.
- Sutherland, R. J., and Rudy, J. W. (1989). Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology* 17, 129–144. doi: 10.3758/BF03337828
- Sutherland, R. J., Whishaw, I. Q., and Kolb, B. (1988). Contributions of cingulate cortex to two forms of spatial learning and memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 8, 1863–1872.
- Swanson, L. W., and Kohler, C. (1986). Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 6, 3010–3023.

[T]

- Thompson, W. G., Guilford, M. O., and Hicks, L. H. (1980). Effects of caudate and cortical lesions on place and response learning in rats. *Psychobiology* 8, 473–479. doi: 10.3758/BF03326478
- Tonkiss, J., Feldon, J., and Rawlins, J. (1990). Section of the descending columns of the fornix produces delay- and interference-dependent working memory deficits. *Behavioural Brain Research* 36, 113–126. doi: 10.1016/0166-4328(90)90166-C
- Tulving, E. (1984). Précis of Elements of episodic memory. *Behavioral and Brain Sciences* 7, 223–268. doi: 10.1017/S0140525X0004440X

[V]

- Voorn, P., Vanderschuren, Louk J M J, Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., and Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences* 27, 468–474. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.006

[W]

- Weiner, I., Feldon, J., Tarrasch, R., Hairston, I., and Joel, D. (1998). Fimbria-fornix cut affects spontaneous activity, two-way avoidance and delayed non matching to sample, but not latent inhibition. *Behavioural Brain Research* 96, 59–70.
- White, N. M., and Milner, P. M. (1992). The psychobiology of reinforcers. *Annual Review of Psychology* 43, 443–471. doi: 10.1146/annurev.ps.43.020192.002303
- White, N. M., and McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 77, 125–184. doi: 10.1006/nlme.2001.4008
- White, N. M., Packard, M. G., and McDonald, R. J. (2013). Dissociation of memory systems: The story unfolds. *Behavioral Neuroscience* 127, 813–834. doi: 10.1037/a0034859
- Wilkinson, L., Khan, Z., and Jahanshahi, M. (2009). The role of the basal ganglia and its cortical connections in sequence learning: evidence from implicit and explicit sequence learning in Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 47, 2564–2573. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2009.05.003
- Wirth, S., Ferry, B., and Di Scala, G. (1998). Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behavioural Brain Research* 91, 49–59.
- Witter, M. P., and Amaral, D. G. (2004). “Hippocampal Formation,” in *The Rat Nervous System*, eds G. Paxinos, Elsevier, 635–704.
- Wright, C. I., and Groenewegen, H. J. (1995). Patterns of convergence and segregation in the medial nucleus accumbens of the rat: relationships of prefrontal cortical, midline thalamic, and basal amygdaloid afferents. *The Journal of Comparative Neurology* 361, 383–403. doi: 10.1002/cne.903610304

[Y]

- Yin, H. H., and Knowlton, B. J. (2002). Reinforcer devaluation abolishes conditioned cue preference: Evidence for stimulus-stimulus associations. *Behavioral Neuroscience* 116, 174–177. doi: 10.1037/0735-7044.116.1.174
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., and Balleine, B. W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *The European Journal of Neuroscience* 19, 181–189. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03095.x
- Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J., and Balleine, B. W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience* 22, 513–523. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x

[Z]

- Zola, S. M., and Mahut, H. (1973). Paradoxical facilitation of object reversal learning after transection of the fornix in monkeys. *Neuropsychologia* 11, 271–284.

Procedural Performance Benefits after Excitotoxic Hippocampal Lesions in the Rat Sequential Reaction Time Task

Sebastian Busse¹ · Rainer K. W. Schwarting¹

Received: 11 March 2015 / Revised: 20 July 2015 / Accepted: 27 July 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract It is widely agreed upon that hippocampal function is linked to episodic-like and spatial memory across various species, for example, rodents. However, the interplay between hippocampal function and other types of learning and memory, like procedural stimulus–response or sequential learning, is less clear. Recently (Eckart et al. in *Hippocampus* 22:1202–1214, 2012), we showed that excitotoxic hippocampal lesions, which mainly affected its dorsal part, led not only to the expected deficits in a spatial and episodic-like memory task, namely the object place recognition test, but also to substantial improvements in terms of speed and accuracy in a rat adaption of the human sequential reaction time task (SRTT). The design of that experiment, however, which included fixed test durations per training day, led to the fact that lesioned animals gained more instrumental experience, which may partly have accounted for their enhanced performance. In order to rule out such a potential confound, we performed the present experiment on rats with similar ibotenic lesions aiming at the dorsal hippocampus, but we now kept the amount of correct instrumental responses and reinforcements on the same level as in controls. Our data revealed that lesioned animals were still able to complete the SRTT in a substantially smaller amount of time, when compared to control and sham-operated animals, although no differences were observable in terms of speed or accuracy. Also, the animals

with lesions showed impaired extinction in a subsequent test where rewards were omitted. The former effect can primarily be attributed to shorter post-reinforcement pauses in the lesioned animals, and the possible mechanisms of this and the extinction effect will be addressed in the discussion.

Keywords Sequential learning · Excitotoxic lesions · Dorsal hippocampus · SRTT · Declarative memory · Rat

Introduction

Since White and McDonald (2002) proposed their “multiple parallel memory theory,” in which they stated the existence of a competitive interaction between declarative (e.g. spatial learning and memory in animals) and non-declarative memory systems represented by the hippocampus, the dorsal striatum, and the amygdala, respectively, evidence supporting this theory has been accumulated (McDonald et al. 2004, 2007; Gruber and McDonald 2012; McDonald and White 2013; White et al. 2013).

Regarding the possible interplay of these brain structures, strong evidence for competitive interaction between the dorsal striatal and hippocampal learning and memory system was presented in a study by McDonald and White (1994), in which rats with dorsal striatal versus hippocampal lesions showed different strategies (cue-response or place-response) of reaching a platform in a Morris water task, while control animals chose both strategies in an equal distribution. In parallel with direct competitive interaction, White and McDonald (2002) suggested that there could also be an output competition between memory systems, namely at the level of the prefrontal cortex. Several neurotoxic lesion and microinfusion studies have

✉ Sebastian Busse
bussese@staff.uni-marburg.de

Rainer K. W. Schwarting
schwarti@staff.uni-marburg.de

¹ Behavioural Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-University of Marburg, Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg, Germany

supported this hypothesis (Killcross and Coutureau 2003; Coutureau and Killcross 2003; McDonald et al. 2007; Tait and Brown 2007), and other evidence suggests that prefrontal neurons coordinate and predict which kind of strategy (hippocampus-based place-learning response or dorsolateral striatum-based egocentric response) a rat will use in a plus-maze learning task (Rich and Shapiro 2007, 2009). Overall, the current evidence suggests that lesions or temporary inactivation of structures that are part of these interacting memory systems, lead to deficits in behavioural flexibility, but can have other adverse or even beneficial effects (Wirth et al. 1998, Cheung and Cardinal 2005; Ito et al. 2005) depending on the given task.

On a further note, functional differences of the hippocampus were proposed (Ferbinteanu and McDonald 2000; Bast and Feldon 2003; Bast et al. 2009; Gruber and McDonald 2012) which are also of importance in order to understand the theory of interacting memory systems mentioned above. While the dorsal hippocampus has been associated preferentially with spatial and relational learning (Fanselow and Dong 2010), as well as timing processes (Tam et al. 2015), the ventral hippocampal connections to amygdala, prefrontal cortex, and nucleus accumbens (Kelley and Domesick 1982; Verwer et al. 1997; Pitkänen et al. 2000) are probably responsible for influencing and facilitating sensorimotor processes (Bast and Feldon 2003), as well as fear conditioning (Bast et al. 2001; Zhang et al. 2001). It can therefore be assumed that inactivation of the dorsal hippocampus may primarily change behaviour that relies strongly on sensory input and procedures that are part of the processing of contextual information in a given learning task, as well as behaviour that is sensitive to temporal aspects of learning and performance (e.g. response timing).

Eckart et al. (2010a, b) showed that sequential learning, a type of procedural, i.e. non-declarative learning, is dependent on the availability of striatal dopamine and can therefore be impaired in rats by lesions of the basal ganglia. While the role of the hippocampus still remains ambiguous in this context, several studies have shown that impairment of the hippocampus may not only spare sequential learning abilities in humans (Nissen 1987; Hopkins et al. 2004; Nagy et al. 2007) but may even increase performance in sequential learning tasks that only require minimal spatial cues in rats (Compton 2004; Eckart et al. 2012; Will et al. 2013). This boosting effect is probably due to the reason that the lesion prevented the competitive impact of the hippocampus in a procedural task which requires no hippocampal information processing.

Continuing on our previous study (Eckart et al. 2012), the present study investigated the effects of ibotenic acid lesions aimed at the dorsal hippocampus on sequential behaviour, as assessed with our food-reinforced rodent

version of the SRTT (Domenger and Schwarting 2005, 2006, 2007, 2008; Schwarting 2009). Three groups (lesioned animals, sham-injected animals, and control animals) were trained in the SRTT on a specific sequence under a fixed ratio schedule (FR13 run) until they reached a stable level of performance. After training, three tests were conducted. First, we presented violated sequences that skipped one sequential item on distinct positions in the presented FR13 run (sequence violation test). In a second test, sequential performance was tested against random stimulus presentation (S-R test). During the third and final test, food was omitted after a fixed amount of FR13 runs to investigate behaviour under extinction conditions.

Even though our previous findings showed superior sequential performance in hippocampus lesioned animals during the SRTT, in comparison to sham and control animals, the underlying mechanism causing the substantial increase in learning performance remained partly unclear. Since training lasted 20 min per day, lesioned animals, which were faster than sham or control animals, gained more learning experience, since they completed a greater amount of FR13 runs in the same period of time. In order to avoid this confound, we changed the testing schedule during the SRTT to a fixed amount of 20 FR13 runs per day, leading to the same amount of training and learning experience for every individual over the whole training period. Additionally, this procedure allowed us to analyse differences in the time each animal needed to complete all FR13 runs per trial (session time). If the assumption is correct that our previous hippocampal lesion effects on SRTT performance were due to differences in training amount, then one should expect that providing identical training amounts in term of FR13 runs should abolish the previously observed boosting effect of the lesion. In order to extend our analyses of hippocampal lesion effects on performance in the SRTT tasks, we added an extinction test, since previous studies in instrumental tasks showed that hippocampal lesions may lead to impaired extinction (Coover et al. 1971; Hirsh 1974; Rawlins et al. 1980).

Materials and Methods

Animals and Maintenance

Twenty-two male Wistar rats (Harlan Laboratories GmbH, Netherlands), weighing 250–274 g on the day of surgery, were used. They were kept in an animal room (21–25 °C; 31–47 % humidity) under a 12:12 h light/dark cycle and were housed individually with ad libitum access to water. After their arrival, the animals were handled on the first three days (5 min each). Experiments were conducted in

accordance with the ethical regulations for animal experimentation at the Philipps-University of Marburg.

Surgery

Surgery was performed under isoflurane (Baxter Deutschland GmbH, Germany) anaesthesia. The coordinates from bregma and the injection volumes for hippocampus lesion were adopted from Bast et al. (2009) and are summarized in Table 1. Injections were made using a home-made injection system with a 1 µl SGE syringe (26 ga, 0.47 mm diam. needle; SGE Analytical Science) that was connected via a polyethylene tube (0.38 mm × 1.09 mm diam.; Plastics One Inc., USA) to the injection cannula (gauge 26, Plastics One Inc., USA). After each injection, the syringe remained in place for about 2 min to allow the neurotoxin to diffuse. The lesion group ($n = 8$) was injected with ibotenic acid (10 mg/ml in 0.1 M phosphate-buffered saline; RandD Systems GmbH, Germany). The sham group ($n = 7$) underwent the same surgical procedure but was injected only with phosphate-buffered saline. The control group ($n = 7$) was not anaesthetized or underwent surgery. After surgery, the animals were given 14 days to recover.

without any test objects for 20 min each. Diffuse white light provided an illumination density of approximately 5 lux at the centre of the box. Twenty four hours after the habituation session, the actual test was conducted. Each rat was presented with two identical sample objects in the first (T_1) and second (T_2) trials. For each rat, we used two silver iron cylinders (5 cm in diameter, 8 cm high). In T_1 , each object was placed in one of the back corners of the box, with the objects situated 15 cm away from the walls. Prior to T_2 , one of the objects was displaced to one of the front corners of the activity box. In T_1 and T_2 , the animal was placed near the front wall and allowed to explore apparatus and objects for 5 min. During the inter-trial interval, the animal was returned to its home cage for 15 min. Behaviour was assessed by measuring distance travelled and time of object exploration. Object exploration was scored when the animal's nose touched the object or when its head was directed towards it within a distance of 5 cm. The object place recognition data were analysed with the VIEWER2[®] programme (Biobserve GmbH, Germany). For statistical analysis, the discrimination ratio during T_2 was calculated as follows (Bevins and Besheer 2006):

$$\frac{\text{Exploration time displaced object}}{\text{Exploration time displaced object} + \text{Exploration time stationary object}}$$

Object Place Recognition Test

The principle set-up and the procedures of the object place recognition test have been described previously (Eckart et al. 2012). In short, 14 days after surgery, the animals were habituated to the test apparatus (home-made open field, 60 × 60 × 40 cm) by placing them into the box

SRTT

Training started 21 days after surgery. During this time period, the animals were food-deprived and received food only during (food pellets, see below) and directly after daily instrumental sessions (Altomin rat chow; Altrumin, Germany), which took place between 9:00 am and 4:00 pm (CET; i.e. the light phase). In order to ensure that the animals maintained 80–85 % of their free feeding weight, they were fed individually after their instrumental sessions with weighted portions of Altromin chow according to their body weight.

For SRTT training and testing (for details see Domenger and Schwarting 2008; Eckart et al. 2012), we used modified operant chambers (MedAssociates Inc., UK) with four LED-equipped holes (i.e. nose-poke holes) arranged in a small recess in a semi-elliptic way tilted towards the pellet-receptacle (photographs of the set-up can be found in Schwarting 2009). The holes were numbered as follows: (1) upper left, (2) upper right, (3) bottom left, and (4) bottom right. The pellet-receptacle was connected to a dispenser, which delivered adjustable pellet amounts

Table 1 Injection coordinates adopted from Bast et al. (2009)

AP (mm from bregma)	ML (mm from bregma)	V (mm from dura)	Volume (µl)
−2,4	±1,0	−3,2	0,05
−3	±3,0	−2,9	0,1
	±1,4	−2,3	0,05
		−3,1	0,05
−4	±3,7	−2,7	0,1
	±2,6	−2,0	0,05
		−3,0	0,05
−5	±5	−4,0	0,05
	±3,9	−3,1	0,05

(dustless precision pellets, 45 mg each; Bioserve, Bilaney Consultants, Germany). During the training session, the animals had to respond to visual stimuli by poking into the illuminated (i.e. active) hole. After a correct response, the light was immediately lit in another hole. The order of the illuminated holes was either pseudo-random (i.e. the same hole was never lit twice in a row) or followed a 12-item-sequence (3-2-4-1-3-4-2-1-2-3-1-4), which is a so-called second-order conditional sequence (Reed and Johnson 1994) since at least two consecutive items are necessary to predict the next one. Responding was reinforced on a fixed ratio schedule of 13 (FR 13), i.e. the reward was delivered after every 13th correct poke. The FR13 schedule combined with a 12-item-sequence ensured that sequence and reinforcement were dissociated, i.e. specific items or parts of the sequence could not be associated with reward delivery.

Basic Training

The basic training and shaping procedures have been described previously (Eckart et al. 2012). In short, the animals were trained daily (20 min each) until they reached the criterion of FR 13. Basic training, which was controlled by the investigator who always ran four animals simultaneously, consisted of three different shaping phases. The first phase was started by placing the animals into the operant chamber, where hole 3 was illuminated and reinforced on FR 1. Animals were shaped until they showed a stable level of poking into hole 3 and subsequent food consumption. When this criterion was reached, the procedure was repeated with the other holes in the following succession: 3-4-2-1. Incorrect pokes (i.e. pokes into any non-lit hole) resulted in a discriminative stimulus by turning on a bright light (house light) and a high-pitched tone (duration: 2 s). In the second shaping phase, the number of pokes before switching the position of the active hole was gradually decreased, until the position was switched after each correct poke. In the third shaping phase, the FR criterion was gradually increased, until the animals reached the necessary FR 13 criterion. Afterwards, a 5 s time limit for poking was applied, i.e. the active hole was illuminated until the animal poked (correct or incorrect) or until the 5 s time limit had expired (termed omission).

SRTT Training

Using the FR 13, the animals were trained daily for an amount of 20 complete FR13 runs, i.e. the number of reinforced runs was identical between subjects, whereas depending on speed and/or accuracy of each subject, the test duration differed. Training proceeded until all groups showed stable levels of performance in terms of no further

significant changes in reaction time, response accuracy, or total session time over three consecutive days. This level was reached after 17 days of training.

Analysed Parameters

Incorrect/Correct Pokes: All pokes into non-illuminated holes, excluding double pokes (two pokes into the same hole within 1 s) were termed “incorrect pokes.” All pokes into illuminated (i.e. active) holes within the 5 s time limit were termed “correct pokes”. **Response accuracy (Acc.):** Here, we calculated the percentage of correct pokes from the total pokes (correct and incorrect pokes). **Reaction time (RT):** For RT analysis, only correct pokes on FR positions 2-13 were taken into account. The latency until the first nose-poke after reward delivery was analysed separately, since it is determined by the post-reinforcement pause (PRP) and therefore substantially longer than all following responses of an FR run. **Session time:** The time required to complete 20 FR runs.

Sequence Violation Test

In this test, which was conducted on day 18, the stimuli were presented in the trained sequential order, but 6 out of the 20 FR 13 runs were violated by skipping the item on the 9th FR position (Domenger and Schwarting 2007). By linking the violations to the FR, the errors occurred on different positions of the sequence. We analysed the effects of violation on reaction times and the amount of errors made by the animals. After this test, three more days of SRTT training were conducted before the subsequent test was performed.

S-R Test

During this test, which was performed on day 22, conditions alternated between two sequence blocks of 10 sequential and 10 random stimulus presentations. The time limit for responding was 5 s, but the active hole was only illuminated for 1 s. In this test, performance should be superior during sequential stimulus presentation, i.e. faster RTs and higher accuracy. After this test, three more days of SRTT training were conducted before the subsequent test was performed.

Extinction Test

In this test, which was performed on day 26, the same FR13 schedule as during the SRTT training was used, but reward omission started after completion of the 11th FR13 run. In contrast to SRTT training, there was no limit in the amount of FR13 runs to complete. The programme stopped

automatically if an animal had ceased poking for at least 5 min (cut-off). Total time needed to complete each FR13 run (time per run) and RTs were analysed and compared between the groups.

Histological Analysis

At the end of the experiment, the rats were deeply anaesthetized with sodium-pentobarbital (Release 300 mg/ml, WDT, Germany) and perfused transcardially with 0.9 % saline and 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed, post-fixed, and cryo-protected (4 % paraformaldehyde—30 % sucrose solution, home-made). Coronal sections of 50 μm were cut on a cryostat (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Germany). Every fourth slice was mounted on a glass slide and stained with cresylviolet. Planimetric measurement was used in order to quantify the cross-sectional area of the hippocampus for all 22 brains on an Axio Imager.M2 microscope (Zeiss, Germany) with a magnification of $2.5\times$.

For each brain, the area (μm^2) of the remaining intact hippocampal tissue (CA1-3 fields, dentate gyrus; excluding the subiculum) in the left and right hemisphere was manually traced with Stereo Investigator 9 (MicroBrightField Inc., USA). In order to derive the estimated volumes (mm^3), the area values for each hemisphere were summed and then multiplied with the slice thickness. Mean values of the control and sham group were defined as baseline (100 %) and used for comparison with the lesion group.

Statistical Analysis

The statistical analysis was done using SPSS (Version 19.0). All data were checked for normal distribution by Kruskal–Wallis tests. Since they fitted the normal distribution, only parametric tests were applied, i.e. *t* tests, ANOVAs (Greenhouse–Geisser-corrected if a violation of sphericity was present) and Tukey-corrected post-hoc tests. The second trial of the object place recognition test was analysed by one-tailed *t* tests (because of the directional hypothesis of an impairment in the lesion group). For this test, the mean discrimination ratios were compared between groups as well as the differences of the mean discrimination ratio from chance. Results from the extinction test were also analysed by one-tailed *t* tests since we expected impaired extinction in the lesion group. Here, averaged RTs and times per run of different segments of the extinction test between all groups were compared. In the sequence violation test, RTs at the 9th-position of violated versus non-violated sequences, as well as RTs at the violated 9th-position versus the preceding 8th position were compared by two-tailed *t* tests. In order to control for the family-wise error rate, all multiple comparisons, which

were not automatically corrected by SPSS, were manually Bonferroni–Holm-corrected and respective *p* values were labelled with p_{adj} . For the calculation of the RTs, only correct pokes (i.e. into illuminated holes) were taken into account. For accuracy, we calculated the percentage of correct pokes from the total pokes (correct and incorrect pokes). *P* values were defined as follows: <0.05 significant; ≤ 0.1 trend; >0.1 no difference. All results are expressed as mean \pm SEM.

Results

Hippocampal Tissue Reduction

Histological analysis (Fig. 1) descriptively showed distinct lesions of the dorsal hippocampus in all animals of the lesion group plus minor damage of the ventral hippocampus and bordering neocortex (prevalently near the injection tracts) in some of the lesioned animals. Furthermore, damage of the dorsal but not the ventral subiculum was visible in all lesioned animals. In all subjects of the sham group, injection tracts were visible, but no gross hippocampal damage was observable.

Histological analysis of the 22 brains revealed total hippocampal estimated volume reductions in the lesion group as compared to controls (left: -58.22 ± 5.44 %, right: -47.88 ± 3.22 %) and sham-operated rats (left: -50.27 ± 6.36 %, right: -45.73 ± 4.28 %). In addition, comparison of the total hippocampus tissue between control and sham group showed smaller estimated volumes in both hemispheres of the sham animals (left: -15.98 ± 3.42 %, right: -3.96 ± 1.97 %). Statistical analysis of the summed estimated volumes for both hemispheres revealed significant group differences ($F_{2,19} = 96.636$; $p < 0.001$). Subsequent post-hoc tests showed significant differences between lesion and control group ($p < 0.001$), as well as between lesion and sham group ($p < 0.001$), but not between control and sham animals ($p = 0.153$).

Object Place Recognition Test

During T_1 , none of the groups showed a preference in exploratory behaviour towards one of the objects nor did the groups differ in the time spent exploring the objects as indicated by an ANOVA with groups as between group factor and objects as repeated measurement factor (group factor: $F_{2,19} = 0.402$; $p = 0.675$; repeated measurement factor: $F_{1,19} = 0.001$; $p = 0.971$), whereas there was a trend for an interaction between these factors ($F_{2,19} = 3.467$; $p = 0.052$). Exploration time of object 1 was 17.43 ± 1.54 s (control); 17.00 ± 2.61 s (sham); and 19.00 ± 1.19 s (lesion), and exploration time of object 2 was 17.43 ± 1.83 s



Fig. 1 Examples of cresyl violet stained brain sections from each group. Pictures were obtained by using an Axio Imager.M2 microscope (Zeiss, Germany). Twelve pictures per slice were taken (2.5× zoom) and were composed into one picture afterwards. The control animal shows an intact dorsal hippocampus, while intense tissue damage is apparent in case of the lesion. Minor tissue damage, caused by the injection tracks, is visible in the sham example

(control); 21.14 ± 2.49 s (sham); and 15.00 ± 2.29 s (lesion).

During T_2 , the groups showed the following exploration times (A) of the displaced object: 13.43 ± 2.18 s (control); 13.57 ± 1.75 s (sham); and 12.13 ± 2.66 s (lesion) and (B) of the stationary object: 8.43 ± 1.57 s (control); 7.57 ± 0.68 s (sham); 11.50 ± 1.56 s (lesion). Statistical

analysis of the mean discrimination ratio (Fig. 2) revealed a significantly lower relative preference of the lesion group towards the displaced object as compared to controls ($t_{13} = 2.34$; $p_{\text{adj}} = 0.039$) and the sham group ($t_{13} = 2.88$; $p_{\text{adj}} = 0.035$). The discrimination ratios of the control and the sham group differed significantly from chance (control: $t_6 = 3.768$; $p_{\text{adj}} = 0.036$; sham: $t_6 = 5.793$; $p_{\text{adj}} = 0.006$), while the lesion group showed no such difference ($t_7 = 0.178$; $p_{\text{adj}} > 0.1$).

SRTT

During the 17-day training period, RTs of the correct pokes (Fig. 3) decreased over days and became asymptotic in all groups (factor days: $F_{3,31;62.95} = 51.963$; $p < 0.001$). The lesion group descriptively showed slightly faster RTs at the beginning of the training period, and these differences diminished over time. Statistically, there was no significant group difference (17-day training period; factor groups: $F_{2,19} = 2.889$; $p = 0.080$), but a significant interaction between training days and groups ($F_{6,63;62.95} = 3.677$; $p = 0.003$). Post-hoc tests on the first and the last training days revealed a significant difference between lesion and sham group on training day 1 ($p_{\text{adj}} = 0.005$), while there were no significant group differences on day 17.

Response accuracy (Fig. 4) increased over training in all three groups (factor days: $F_{3,90;74.16} = 14.531$; $p < 0.001$). There were no significant difference between groups ($F_{2,19} = 0.837$; $p = 0.448$) and no significant interaction between training days and groups ($F_{7,81;74.16} = 1.12$; $p = 0.36$). All groups reached a performance level of more than 90 % correct pokes after about 12 days of training

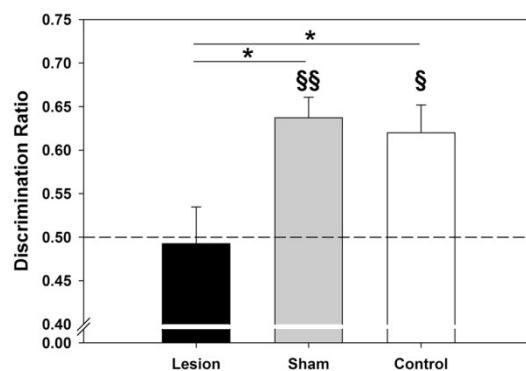


Fig. 2 Object place recognition test: discrimination ratio in Trial 2 (means + SEM), where one of the objects presented in Trial 1 was displaced, whereas the other object was kept in place. Values above 0.5 indicate a preference towards the displaced object; chance discrimination is indicated by the dashed line. * $p_{\text{adj}} < 0.05$ (between groups); \$ $p_{\text{adj}} < 0.05$, ** $p_{\text{adj}} < 0.01$ (as compared with chance)

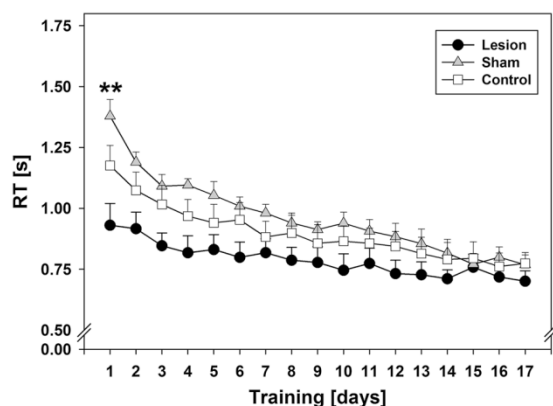


Fig. 3 Reaction times (RTs) in seconds during the 17-day training period. Each data point reflects the mean of 20 successful FR13 runs (+SEM). First and last days of training were analysed for group differences. ** $p_{\text{adj}} < 0.01$

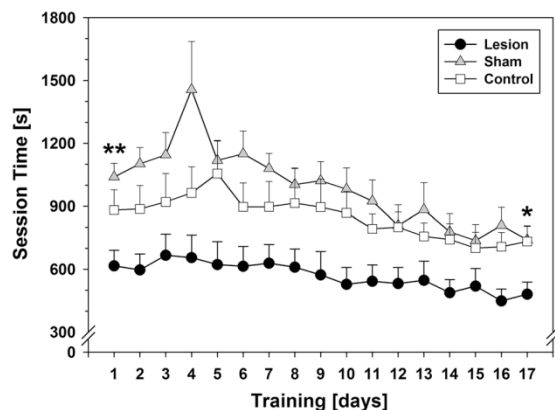


Fig. 5 Session times during the 17-day training period in seconds. Each data point reflects the mean of complete session times (+SEM). First and last days of training were analysed for group differences. * $p_{\text{adj}} < 0.05$; ** $p_{\text{adj}} < 0.01$

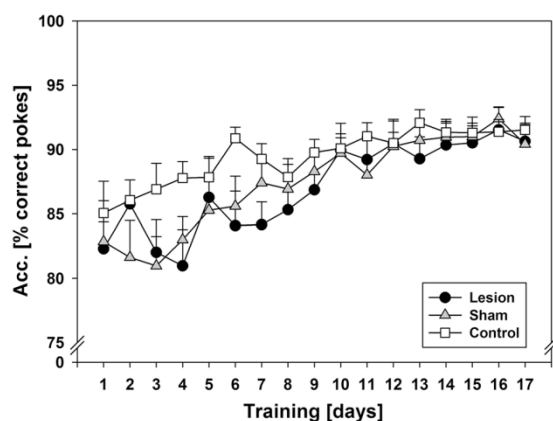


Fig. 4 Accuracy (Acc.) during the 17-day training period in terms of mean % of correct pokes. Each data point reflects the mean of 20 successful FR13 runs (+SEM). Analysis of the first and last training days revealed no differences between the groups

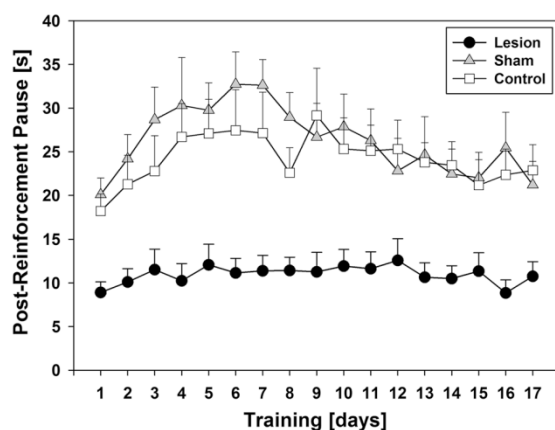


Fig. 6 Post-reinforcement pauses (PRPs) during the 17-day training period in seconds (means + SEM). Post-hoc analyses of all training days revealed group differences between lesion group and control group ($p = 0.03$), as well as between lesion group and sham group ($p < 0.01$)

(lesion: 90.45 ± 5.34 %; sham: 90.24 ± 5.2 %; control: 90.51 ± 2.21 %).

Session Time (Fig. 5) decreased in all three groups over training (factor days: $F_{4,44;84,44} = 12.57$; $p < 0.001$). Also, there was a significant group effect ($F_{2,19} = 6.612$; $p = 0.007$), and a trend for a significant interaction between days and groups ($F_{8,89;84,44} = 1.978$; $p = 0.053$). Post-hoc tests revealed a significant difference between lesion and sham group ($p = 0.006$), and a trend between lesion and control group ($p = 0.07$). Subsequent post-hoc tests for the first and last days of training revealed shorter session times in the lesion group as compared to the sham

group on day 1 ($p_{\text{adj}} = 0.007$) and 17 ($p_{\text{adj}} = 0.028$), as well as between lesion and control on day 17 ($p_{\text{adj}} = 0.033$). Comparison of sham and control showed no significant differences on training days 1 and 17.

Comparing PRPs between groups over the 17 training days showed a group effect ($F_{2,19} = 12.244$; $p < 0.001$) but not interaction between days and groups ($F_{8,59;81,61} = 1.400$; $p > 0.1$). Post-hoc tests revealed that the lesioned animals needed significantly less time until they resumed responding (Fig. 6) compared to the control ($p = 0.03$) and the sham group ($p < 0.01$). No significant difference was present between control and sham animals.

Sequence Violation Test

When non-violated sequences were presented, all three groups showed a typical FR13 run, during which RT decreased over the course of the 13 positions (Fig. 7).

When violated sequences were presented, the curve patterns of the control and the lesion group were slightly interrupted at the violated positions. In controls, this was indicated by significantly slower RTs at the violated 9th position, as compared with the preceding 8th position ($t_6 = 3.215$; $p_{\text{adj}} = 0.037$). The sham and the lesion group showed no significant differences in RTs between the 8th and the 9th position (lesion: $t_7 = 2.444$; $p_{\text{adj}} = 0.067$; sham: $t_6 = 1.085$; $p_{\text{adj}} = 0.160$). Comparison between the 9th position of violated and non-violated sequences revealed significantly slower violated RTs in the control and the lesion group (control: $t_6 = 4.538$; $p_{\text{adj}} = 0.01$; lesion: $t_7 = 5.086$; $p_{\text{adj}} = 0.004$), but not in the sham group ($t_6 = 1.653$; $p_{\text{adj}} = 0.149$).

Error analysis at the violated 9th position showed that all groups made significantly less false responses than correct responses ($p_{\text{adj}} < 0.001$) and no significant differences were found between groups ($p_{\text{adj}} > 0.05$).

S-R Test

In this test, the first 10 FR13 runs were presented in sequential order, while the last 10 FR13 runs followed a random stimulus presentation. Significant differences between the conditions were found in favour of the sequential condition, but in order to rule out that these outcomes were flawed by the duration of testing, we examined the prior SRTT training day, which consisted only of sequential stimuli, and compared this data with the S-R test. Accuracy decreased during random stimulus presentation and remained largely constant during sequence presentation (Fig. 8). Statistical analysis with accuracy change (% Δ) of both conditions as repeated measurement factor showed a significant effect ($F_{1,19} = 15.360$; $p < 0.001$), while no group effect and no interaction were found. Similar analysis for RTs revealed no differences between the conditions or the groups (data not shown).

Extinction Test

During the extinction test, the lesion group completed significantly more FR13 runs (Fig. 9) than the sham and the control group until they ceased responding (ANOVA; between subjects: $F_{2,19} = 7.465$; $p = 0.004$; Post-hoc tests; comparison lesion and sham group: $p = 0.004$;

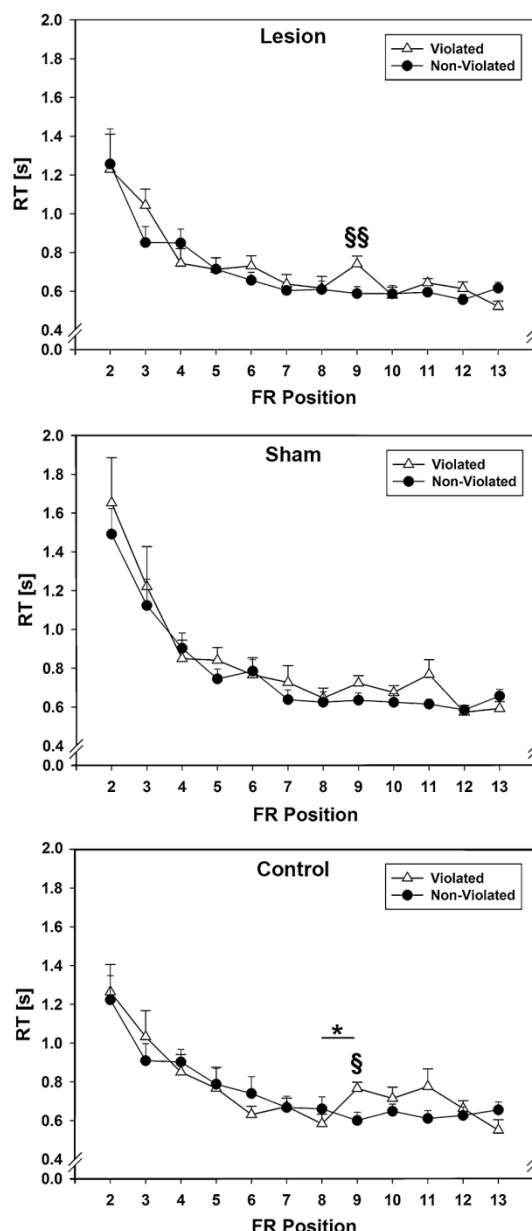


Fig. 7 Reaction times (RTs, means + SEM) in the sequence violation test. Serial patterns of regular and violated sequences of the lesion, sham, and control group. The violations occurred at position 9 of the FR schedule in 6 out of 20 FR13 runs. The 1st response after food delivery is shown separately (see Fig. 6). \$: position 8 versus violated position 9, $p_{\text{adj}} < 0.05$; *: violated position 9 versus position 9 of non-violated sequence, $p_{\text{adj}} < 0.01$, $*p_{\text{adj}} < 0.05$

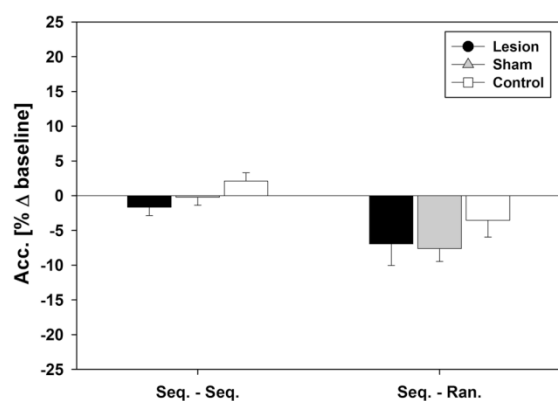


Fig. 8 Accuracy change from baseline (Acc. means + SEM); comparison of SRTT day 17 (seq.-seq.) and S-R test (seq.-ran.). Baseline represents means of the first 10 FR13 runs from each test day, which had a sequential order. Vertical bars show % Δ from baseline during the last 10 FR13 runs, which had either a sequential or random order

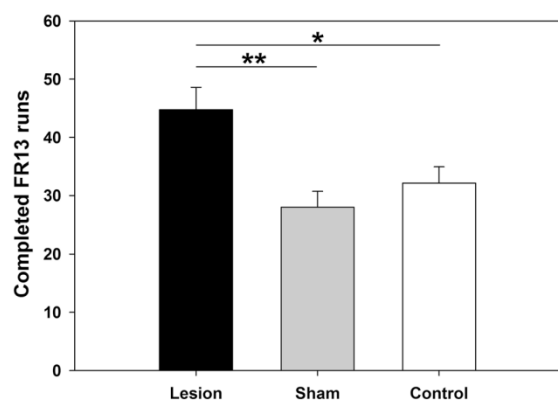


Fig. 9 Extinction test: Number of completed FR13 runs (mean + SEM) until a given animal stopped poking into any of the holes for at least 5 min. $**p_{adj} < 0.01$, $*p_{adj} < 0.05$

comparison lesion and control group: $p = 0.031$). There was no significant difference between the sham and the control group ($p = 0.659$).

In order to analyse behaviour under extinction in more detail, reaction times and time per FR run for each individual were investigated (Fig. 10). After completion of the 29th FR13 run, one of the animals in the sham group reached the cut-off criterion, which made further comparison between the groups unreliable.

When analysing RTs and times per run over the course of 29 FR13 runs in a descriptive manner, three segments became apparent: Before reward omission (1st–11th run), animals showed behaviour similar to the previous FR13 runs during SRTT. After reward omission, all groups began to show an extinction burst (starting with the 12th run),

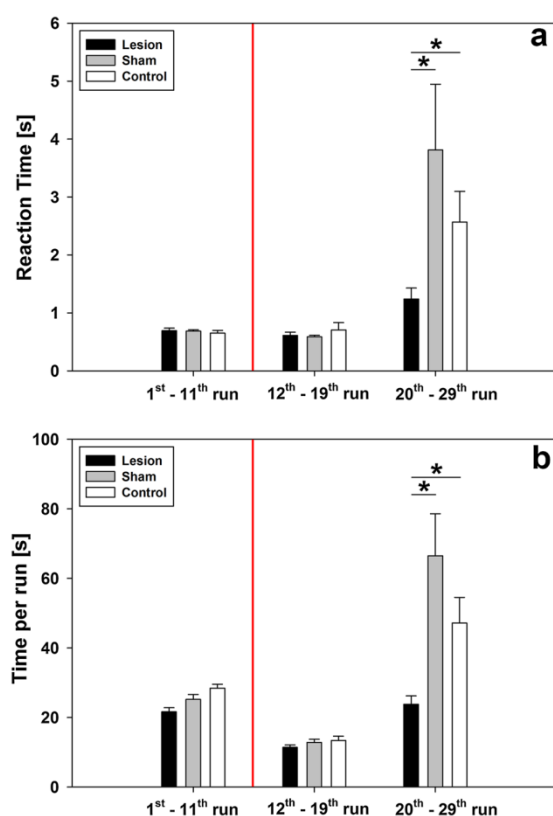


Fig. 10 Extinction test: Comparison of reaction times (RTs) and time per run averaged over 3 segments, which were defined based on the curve progression over the 29 analysed FR 13 runs (mean + SEM). The red line separates the segments before and after reward omission. T tests between the groups were only conducted for last segment (20th–29th run). $*p_{adj} < 0.05$ (Color figure online)

resulting in a sudden performance increase (shorter times per run, mainly caused by the lack of PRPs) which lasted until about the 19th run in the control and sham group. Thereafter (20th to 29th run), control and sham animals showed a decline in their response frequency, with large variability in RTs and times per run, until they stopped responding completely. In contrast, the lesion group showed a shallower decline in their instrumental behaviour and a more stable response frequency, even after the 29th run.

For statistical analysis, RTs and times per run (1st–11th run, 12th–19th run, and 20th–29th run) were averaged and analysed in a repeated measure analysis with the segments as factor and groups as between-subject factor. Calculations for RTs revealed a difference between the three segments ($F_{1,019;19,357} = 22.447$; $p < 0.001$) and an interaction between the segments and groups ($F_{2,038;19,357} = 3.616$; $p = 0.046$), while only a trend regarding group

differences ($F_{2;19} = 3.070$; $p = 0.07$) was present. Post-hoc *t* tests during the last segment (20th–29th run) revealed shorter RTs in the lesion than the sham group ($t_{13} = 2.392$; $p_{\text{adj}} = 0.049$) and the control group ($t_{13} = 2.357$; $p_{\text{adj}} = 0.048$). No RT difference was found between control and sham group.

Calculations for times per run also revealed a difference between the segments ($F_{2;1.07} = 19.910$; $p < 0.001$), but only a trend for a group difference ($F_{2;19} = 3.106$; $p = 0.068$) and for interactions between the segments and groups ($F_{2,13;20,25} = 3.274$; $p = 0.056$). Post-hoc *t* tests in the last segment revealed differences between lesion and sham group ($t_{13} = 2.340$; $p_{\text{adj}} = 0.035$) and between lesion and control group ($t_{13} = 2.463$; $p_{\text{adj}} = 0.042$). No RT difference was found between control and sham group.

Discussion

In this study, we were able to provide evidence that hippocampal-lesioned animals do not show persistent performance enhancement in terms of increased accuracy and RTs during the SRTT, when training amount is kept equal between individuals. Nevertheless, there still were somehow beneficial lesion effects, namely shorter session times (i.e. faster completion of 20 FR runs), shorter PRPs, but also impaired extinction behaviour in comparison to control- and sham-injected animals. Histological analysis and other behavioural validation (object place recognition) of the lesion effect were in line with expectations of previous studies. The results from the sequence violation test indicate a higher degree of automated sequential behaviour in lesion and control group, while the S-R test revealed a decrease of accuracy in all groups during random stimulus presentation.

Histological Analyses and Object Place Recognition Test

Histological analysis and the object place recognition test both validated the lesion on the morphological and behavioural level, respectively. While hippocampal tissue reduction was similar to our prior experiment (Eckart et al. 2012), control and sham groups showed normal exploratory behaviour towards the displaced object during the object place recognition test, whereas the lesion group showed the expected deficit. Previously, Eckart et al. (2012) found a deficit in the sham group, and other sham surgical procedures were also found to cause behavioural and mnemonic deficits, as well as neurochemical changes (Adams et al. 1994; Raghavendra Rao et al. 2000; Grossman et al. 2003; Hirshler et al. 2010). The lower hippocampal volumes found in the sham group of the present

study may be a result of the surgery, but since statistical analysis between control and sham animals showed no significant differences in total hippocampal volumes, it is unclear if the observed lower performance in the sham group was caused by anaesthesia, minor surgery-induced damage, or a general variability of the behavioural measures used. In any case, it seems clear that sham surgeries can result in ambiguous behavioural changes that may depend on the methodology used during surgery, which can make data obtained from sham animals difficult to interpret.

In contrast, our results in the object place recognition task substantiate the hypothesis that the observed spatial memory deficits in the lesion group are not a side effect of the surgery, but lesion specific. In this line, Spanswick and Sutherland (2010) provided evidence that the dentate gyrus is strongly involved in object/context discrimination tasks. A selective loss of granule cells within the dentate gyrus rendered rats unable to remember that an object was previously encountered in a particular context. These findings may play a role in the observed behaviour of the lesion group during the SRTT, since damage of the dentate gyrus was present in the lesion group.

SRTT

The previously observed boosting effect of dorsal hippocampal lesions, namely an increase in sequential accuracy and decreases in RTs, was very likely caused by the 20-min training durations used there, since our current findings with a fixed number of FR runs revealed no stable difference between the groups regarding these two parameters. However, the shorter session times observed in the lesion group are in accordance with prior reports in the literature, which state that animals with hippocampal lesions acquire motor-response tasks faster (McDonald and White 1993; Chang and Gold 2003a, b; Jacobson et al. 2012). Remarkably, the difference in session time between the groups consisted throughout the whole training period, while RTs differed only at the beginning of the SRTT training and evened out towards the end.

Since RTs did not differ between the groups during the last days of the training period, the question arises how the lesioned animals were able to complete the runs faster than controls and sham-injected animals. Investigation of the PRPs showed that the lesioned animals spent two- to threefold less time between finishing a run and starting the next one. This leads us to the assumption that the lesioned animals did not necessarily differ in their ability to acquire the instrumental task, but rather in the presence or absence of other behaviour apart from completing the task (e.g. exploration, grooming behaviour). Decreased occurrences of any behaviour apart from completing the sequential

learning task would ultimately provide an advantage for lesioned animals over control- and sham-injected animals. This idea is further substantiated by previous findings that show evidence for the disruption of active exploration patterns and exploratory flexibility in spatially extended environments, caused by hippocampal lesions (Gray and McNaughton 2000). Especially noteworthy is the associated loss of rearing behaviour in hippocampal-ablated animals, which is used as a common measure of exploratory behaviour. Even though the environment provided by the SRTT boxes cannot be classified as spatially extended, an overall decrease in exploratory behaviour present in the lesion group seems likely, since the reduced PRPs cannot solely be responsible for the overall shorter session times in the lesion group. However, in order to examine this assumption, further behavioural observation and measurements (i.e. video tracking and recording during PRPs) are necessary, since the methods used in this study did not allow specific analyses of behaviour during these phases.

The length of PRPs has been linked to hedonically pleasurable (long PRPs) and frustrating outcomes in rats (short PRPs), which could also play a role in the present effects (Peters et al. 2010). Even though rewards for all groups were the same and should therefore have had similar pleasurable outcomes for each individual, lesioned animals seemed to spend little time after receiving the food pellets, namely as much as it supposedly took them to eat all 4 food pellets, before starting the next run. On the one side, this pattern could indicate a decrease in hedonic impact of the food reward for hippocampal-lesioned animals. On the other side, this may suggest the presence of a more indifferent motivational state in hippocampal-ablated animals regarding reward outcomes. In contrast, Gilbert and Kesner (2002) showed that hippocampal-ablated animals are able to discriminate between reward values similar to control animals. Additionally, a study conducted by Schmelzeis and Mittleman (1996) suggests that hippocampal lesions can alter the hedonic impact of food rewards, which was shown in animals that were trained under a progressive-ratio schedule of food reinforcement. They reported significant increases in breakpoint, which was used as a measure for the amount of effort an animal exerted to obtain a reward, after animals were lesioned. Schmelzeis and Mittleman further showed that changing the food reward from grain pellets to more rewarding sucrose pellets increased the breakpoint in hippocampal-lesioned animals significantly more than in control animals. However, since they used a different reinforcement schedule and also did not report differences in PRPs between lesion and control animals, a comparison between results of their and our study is limited.

Another explanation for shorter PRPs could be a disruption of decision-making processes. It has been shown that dorsal, ventral, and complete hippocampal lesions

increase impulsive choice behaviour and lead to an increased preference for immediate low-reward options in contrast to delayed high-reward options in spatial (McHugh et al. 2008) and non-spatial decision-making tasks (Mariano et al. 2009). Since reward in the SRTT was given immediately after completing a FR13 run and animals could freely start the next run, an increased impulsive choice behaviour could have contributed to the observed shorter PRPs.

Sequence Violation Test

In the sequence violation test, significantly increased RTs at the violated position indicated an interruption of the sequence in comparison to non-violated runs, which was observed in the lesion and control groups. In contrast, the sham group did not show similar behaviour. These results are comparable to those observed in our previous SRTT experiments (Domenger and Schwarting 2007, 2008; Eckart et al. 2010a, b; Eckart et al. 2012) and suggest a higher degree of automated sequential behaviour in lesion and control group. The fact that no effect was observed in the sham group may be due to tissue damage and irritation due to the multiple brain penetrations, which led to a quantifiable loss in dorsal hippocampal tissue and to some damage in the overlying neocortex. Unspecific cortical damage occurred also in the lesion group, but its impact may be superimposed by the damage of the hippocampus, which has beneficial effects on SRT performance. Another explanation for the lack of an observable effect in the sham group may be due to some variability of this behavioural task, since no significant differences in hippocampal volume between sham and control group were found.

S–R Test

In the S–R test, all groups showed a decrease in accuracy when random stimuli were presented after a period of sequential ones. This effect is comparable to results from our prior studies and again indicates a positive influence of sequential stimulus presentation on performance during the SRTT. While the results from the S–R test also revealed longer RTs during random stimulus presentation in all groups, we cannot rule out that this effect might be flawed by the duration of testing itself, since random stimuli were presented in the last half of the test, and a similar effect for RTs was observed when we analysed the prior day of normal training. In order to resolve this temporal issue, future testing should rely on 4 blocks of sequential and random stimulus presentation (sequential₁–random₁–sequential₂–random₂) with adequate amounts of FR runs to complete per block, similar to what was used in previous experiments (Eckart et al. 2010a, b, 2012).

Extinction Test

Under extinction conditions, the lesion group showed impaired extinction behaviour, with more completed runs despite food omission and a shallower decline of their response frequency. This effect may indicate a transition from goal-oriented action outcome to habitual stimulus–response behaviour in these animals. It has previously been shown that extensive training can lead behaviour to become largely dependent upon the dorsal lateral striatum (Graybiel 2008). Since all groups in our study were provided with equal amounts of training, it is probable that the lesion group needed less amounts of training until transitioning to habitual behaviour. Incorporating the “multiple parallel memory theory” by White and McDonald (2002), one might assume that loss of hippocampal function, e.g. regarding the mechanism of learning the associations between causes and outcomes (Wise and Murray 2000), could strengthen the interaction between the dorsal lateral striatum and the prefrontal cortex, allowing habitual stimulus–response behaviour to develop more quickly. Furthermore, it has been shown that the absence of hippocampal function can disrupt normal patterns of behaviour (e.g. hoarding behaviour, see Wishart et al. 1969; Wallace and Tigner 1972), which lets animals to continue on a task even though initial needs (eating, drinking) have already been satisfied (Kimble 1968). This could indicate again faster transition into habitual behaviour, due to a lack of inhibitory control thought to be mediated by the hippocampus (Isaacson and Kimble 1972). Since the dorsal hippocampus is strongly interconnected with ventral areas of the hippocampus (Amaral and Witter 1989, 1995), lesions that mainly affect the dorsal hippocampus and spare the ventral parts may alter ventral hippocampus activity which could facilitate development of habitual behaviour also.

General Discussion

A plethora of partly ambiguous findings regarding the behavioural changes that occur as a result of hippocampus ablations in humans and animals can be found in the literature since the 1960s. However, a common ground of many studies seems to be the assumption that the interaction between hippocampus, amygdala, and dorsal striatum and their respective projections into neocortical areas are important in order to allow assessment and prioritizing of external stimuli and internal needs, as well as the creation of appropriate responses in order to react to stimuli and needs according to their importance (Hirsh 1974; Simonov 1991; White et al. 2013; Cameron and Glover 2015). As a consequence, disruption of this network leads to a variety of complex behavioural changes.

Since our findings with fixed amounts of training indicate no difference in sequential accuracy and RTs between controls and dorsal hippocampal-lesioned animals, but instead faster completion of the identical sequential task largely due to shorter PRPs, as well as impaired extinction during food omission, it is a possibility that the hippocampal ablations led to a diminished ability to appropriately assess the importance of external stimuli during the training and extinction trials of the SRTT. The omnipresence of the illuminated nose-poke holes possibly established itself as the most dominant stimulus during the shaping and training trials. Decreased awareness for potentially aversive or distracting stimuli after hippocampal lesions (in this study: e.g. the lit up house light and high-pitched tone after an error or omission) during mnemonic tasks has been described previously (Machado and Bachevalier 2008; Chudasama et al. 2008, 2009), as well as a decrease of emotional responses (e.g. lack of frustration, “hesitation and doubt”) and a shift to a behaviour controlled primarily by external stimuli, but not motivational states, i.e. habit formation (Kimble 1968; Coover et al. 1971; Isaacson and Kimble 1972; Hirsh 1974; Simonov 1974, 1991). Therefore, the lesioned animals might have lacked the motivational ability to pursue other internal needs and other external stimuli (e.g. exploration, grooming, and noises). This could potentially explain why the lesioned rats in our study spent only around one-third of the time during the PRPs as compared to shams and controls, probably since the lesioned animals were not deterred from continuing the learned task by distracting external stimuli or internal needs. Furthermore, decreased influences of emotional responses and increased habit formation mediated by the dorsal striatum would also indicate why an impairment of extinction behaviour was present in the hippocampal-ablated animals. Alternative explanations for a slower extinction in hippocampal-ablated animals include deficits in adapting to new behavioural strategies, if the original learned strategy fails or is not as lucrative as before. Isaacson and Kimble (1972) showed that naïve rats tend to develop a bias on how to approach a given learning task (e.g. preference of the low-lit arm of a Y-maze instead of the well-lit arm) and depending on the rules set by the design of the task, these biases either led to correct responses or the rats had to adapt to a new strategy in order to maximize the reward. Hippocampal-ablated rats held longer onto their initial bias, when it did not lead to correct responses, than control animals. On the contrary, when the initial strategy led to the arm with the reward, performance in hippocampal-lesioned animals was as good as, or better than, that of controls.

Furthermore, slower extinction in lesioned animals could be attributed to a loss of inhibition of ongoing behaviours, and inhibition was once commonly thought to

be a primary function of the hippocampus (Douglas 1967; Silveira and Kimble 1968; Altman et al. 1973; Gray and McNaughton 2000). However, more recent research using temporary pharmacological manipulations of specific hippocampal areas by local drug microinfusions suggests that changes in locomotor activity cannot be associated to a loss of general inhibitory function of the hippocampus, but rather to compensatory adjustments in extra-hippocampal structures that are normally influenced by the locomotor drive provided by the ventral hippocampus (Bast and Feldon 2003). As suggested by several studies (Flicker and Geyer 1982a, b; Mogenson and Nielsen 1984; Nazar et al. 1999), the dorsal hippocampus has an influence on locomotor activity (e.g. through intrahippocampal connections between dorsal and ventral hippocampus), it is possible that changes in locomotor patterns may have contributed to the observed slower extinction in the lesioned animals, similar to the possible increase in impulsive choice behaviour stated earlier. However, since no locomotor hyperactivity was observed during the object place recognition test or SRTT, it is unlikely that such an effect was critical in the hippocampal-ablated animals. Also, locomotor hyperactivity should have resulted in a general increase in behavioural activities over the whole period of time, not just specifically during the extinction test. Quite the contrary, the lesion group showed shorter session times and PRPs which indicates a stronger motivation to perform the task or a stronger focus on the completion of the task, rather than a increase in all active behaviours (such as exploration, grooming, rearing etc.). Moreover, it has been shown that hippocampal lesions can facilitate nucleus accumbens dopamine transmission (Wilkinson et al. 1993, Mittleman et al. 1993), and this increase in nucleus accumbens dopamine transmission can lead to increased task motivation or instrumental responding (Taylor and Robbins, 1984). However, the results obtained during the present study do not support these ideas. Hippocampal-ablated animals showed no difference in their RTs and accuracy at the end of the SRTT training, while session times were significantly lower, due to shorter PRPs and an increased focus on completing the task instead of participating in behaviours apart from the instrumental task. We assume that this does not indicate increased ability in instrumental responding, but differences in arranging attention and decision-making.

In conclusion, our study provides evidence that animals with lesions, which largely affect the dorsal hippocampus, are able to complete an sequential instrumental task in a substantial smaller amount of time than controls. Since this was a stable effect that did not diminish over increasing amounts of training time and which can primarily be attributed to shortened PRPs, it is highly probable that due to the lesion, a change regarding the assessment and

prioritizing of external stimuli and internal needs took place. The observed impairment of extinction supports this idea. Moreover, our results reinforce the hypotheses of the existence of dissociated memory systems, with hippocampus, amygdala, and dorsal striatum as their central structures and emphasize the importance of their interactions.

Acknowledgments This work was supported by Grant SCHW 559/12-1 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft. Thanks to Janine Roscher for support in data acquisition and analysis.

References

- Adams FS, Schwarting RK, Huston JP (1994) Behavioral and neurochemical asymmetries following unilateral trephination of the rat skull: is this control operation always appropriate? *Physiol Behav* 55:947–952
- Altman J, Brunner RL, Bayer SA (1973) The hippocampus and behavioral maturation. *Behav Biol* 8:557–596
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571–591
- Amaral DG, Witter MP (1995) Hippocampal formation. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system*. Academic Press, San Diego, pp 443–493
- Bast T, Feldon J (2003) Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog Neurobiol* 70:319–345
- Bast T, Zhang WN, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol. *Exp Brain Res* 139:39–52
- Bast T, Wilson IA, Witter MP, Morris RGM (2009) From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol* 7:e1000089
- Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1:1306–1311
- Cameron HA, Glover LR (2015) Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev Psychol* 66:53–81
- Chang Q, Gold PE (2003a) Intra-hippocampal lidocaine injections impair acquisition of a place task and facilitate acquisition of a response task in rats. *Behav Brain Res* 144:19–24
- Chang Q, Gold PE (2003b) Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J Neurosci* 23:3001–3005
- Cheung THC, Cardinal RN (2005) Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci* 6:36
- Chudasama Y, Wright KS, Murray EA (2008) Hippocampal lesions in rhesus monkeys disrupt emotional responses but not reinforcer devaluation effects. *Biol Psychiatry* 63:1084–1091
- Chudasama Y, Izquierdo A, Murray EA (2009) Distinct contributions of the amygdala and hippocampus to fear expression. *Eur J Neurosci* 30:2327–2337
- Compton DM (2004) Behavior strategy learning in rat. effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behav Process* 67:335–342
- Coover GD, Goldman L, Levine S (1971) Plasma corticosterone levels during extinction of a lever-press response in hippocampectomized rats. *Physiol Behav* 7:727–732

- Coutureau E, Killcross S (2003) Inactivation of the infralimbic prefrontal cortex reinstates goal-directed responding in over-trained rats. *Behav Brain Res* 146:167–174
- Domenger D, Schwarting RK (2005) Sequential behavior in the rat. A new model using food-reinforced instrumental behavior. *Behav Brain Res* 160:197–207
- Domenger D, Schwarting RK (2006) The serial reaction time task in the rat. Effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists. *Behav Brain Res* 175:212–222
- Domenger D, Schwarting RK (2007) Sequential behavior in the rat. Role of skill and attention. *Exp Brain Res* 182:223–231
- Domenger D, Schwarting RK (2008) Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on performance in a rat sequential reaction time task. *Neurosci Lett* 444:212–216
- Douglas RJ (1967) The hippocampus and behavior. *Psychol Bull* 67:416–422
- Eckart MT, Hulse-Matia MC, Loer D, Schwarting RK (2010a) Acquisition and performance in a rat sequential reaction time task is not affected by subtotal ventral striatal 6-OHDA lesions. *Neurosci Lett* 476:21–31
- Eckart MT, Hulse-Matia MC, McDonald RS, Schwarting RK (2010b) 6-Hydroxydopamine lesions in the rat neostriatum impair sequential learning in a serial reaction time task. *Neurotox Res* 17:287–298
- Eckart MT, Hulse-Matia MC, Schwarting RKW (2012) Dorsal hippocampal lesions boost performance in the rat sequential reaction time task. *Hippocampus* 22:1202–1214
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7–19
- Ferbinteanu J, McDonald RJ (2000) Dorsal and ventral hippocampus: same or different? *Psychobiology* 28:314–324
- Flicker C, Geyer MA (1982a) Behavior during hippocampal microinfusions. II: muscarinic locomotor activation. *Brain Res* 257:105–127
- Flicker C, Geyer MA (1982b) Behavior during hippocampal microinfusions. III: lidocaine versus picrotoxin. *Brain Res* 257:129–136
- Gilbert PE, Kesner RP (2002) The amygdala but not the hippocampus is involved in pattern separation based on reward value. *Neurobiol Learn Mem* 77:338–353
- Gray JA, McNaughton N (2000) The neuropsychology of anxiety. An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford University Press, Oxford
- Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359–387
- Grossman R, Shohami E, Alexandrovich A, Yatsiv I, Kloog Y, Biegon A (2003) Increase in peripheral benzodiazepine receptors and loss of glutamate NMDA receptors in a mouse model of closed head injury: a quantitative autoradiographic study. *Neuroimage* 20:1971–1981
- Gruber AJ, McDonald RJ (2012) Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Front Behav Neurosci* 6:50
- Hirsh R (1974) The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav Biol* 12:421–444
- Hirshler YK, Polat U, Biegon A (2010) Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Exp Neurol* 222:42–50
- Hopkins RO, Waldram K, Kesner RP (2004) Sequences assessed by declarative and procedural tests of memory in amnesic patients with hippocampal damage. *Neuropsychologia* 42:1877–1886
- Isaacson RL, Kimble DP (1972) Lesions of the limbic system: their effects upon hypotheses and frustration. *Behav Biol* 7:767–793
- Ito R, Everitt BJ, Robbins TW (2005) The hippocampus and appetitive Pavlovian conditioning: effects of excitotoxic hippocampal lesions on conditioned locomotor activity and autoshaping. *Hippocampus* 15:713–721
- Jacobson TK, Gruenbaum BF, Markus EJ (2012) Extensive training and hippocampus or striatum lesions: effect on place and response strategies. *Physiol Behav* 105:645–652
- Kelley AE, Domesick VB (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 7:2321–2335
- Killcross S, Coutureau E (2003) Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cereb Cortex* 13:400–408
- Kimble DP (1968) Hippocampus and internal inhibition. *Psychol Bull* 70:285–295
- Machado CJ, Bachevalier J (2008) Behavioral and hormonal reactivity to threat: effects of selective amygdala, hippocampal or orbital frontal lesions in monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 33:926–941
- Mariano TY, Bannerman DM, McHugh SB, Preston TJ, Rudebeck PH, Rudebeck SR, Rawlins JNP, Walton ME, Rushworth MFS, Baxter MG, Campbell TG (2009) Impulsive choice in hippocampal but not orbitofrontal cortex-lesioned rats on a nonspatial decision-making maze task. *Eur J Neurosci* 30:472–484
- McDonald RJ, White NM (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 107:3–22
- McDonald RJ, White NM (1994) Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol* 61:260–270
- McDonald RJ, White NM (2013) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 127:835–853
- McDonald RJ, Foong N, Hong NS (2004) Incidental information acquired by the amygdala during acquisition of a stimulus-response habit task. *Exp Brain Res* 159:72–83
- McDonald RJ, Foong N, Ray C, Rizos Z, Hong NS (2007) The role of medial prefrontal cortex in context-specific inhibition during reversal learning of a visual discrimination. *Exp Brain Res* 177:509–519
- McHugh SB, Campbell TG, Taylor AM, Rawlins JNP, Bannerman DM (2008) A role for dorsal and ventral hippocampus in intertemporal choice cost-benefit decision making. *Behav Neurosci* 122:1–8
- Mittleman G, LeDuc PA, Whishaw IQ (1993) The role of D1 and D2 receptors in the heightened locomotion induced by direct and indirect dopamine agonists in rats with hippocampal damage: an animal analogue of schizophrenia. *Behav Brain Res* 55:253–267
- Mogenson GJ, Nielsen M (1984) A study of the contribution of hippocampal-accumbens-subpallidal projections to locomotor activity. *Behav Neural Biol* 42:38–51
- Nagy H, Keri S, Myers CE, Benedek G, Shohamy D, Gluck MA (2007) Cognitive sequence learning in Parkinson's disease and amnesic mild cognitive impairment. Dissociation between sequential and non-sequential learning of associations. *Neuropsychologia* 45:1386–1392
- Nazar M, Siemiatkowski M, Członkowska A, Sienkiewicz-Jarosz H, Płażnik A (1999) The role of the hippocampus and 5-HT/GABA interaction in the central effects of benzodiazepine receptor ligands. *J Neural Transm* 106:369–381
- Nissen MJBP (1987) Attentional requirements of learning. Evidence from performance measures. *Cognit Psychol* 19:1–32
- Peters H, Hunt M, Harper D (2010) An animal model of slot machine gambling: the effect of structural characteristics on response latency and persistence. *J Gambl Stud* 26:521–531

- Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369–391
- Raghavendra Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Dempsey RJ (2000) Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Exp Neurol* 161:102–114
- Rawlins JN, Feldon J, Gray JA (1980) The effects of hippocampectomy and of fimbria section upon the partial reinforcement extinction effect in rats. *Exp Brain Res* 38:273–283
- Reed J, Johnson P (1994) Assessing implicit learning with indirect tests: determining what is learned about sequence structure. *J Exp Psychol Learn Mem Cognit* 20:585–594
- Rich EL, Shapiro ML (2007) Prelimbic/infralimbic inactivation impairs memory for multiple task switches, but not flexible selection of familiar tasks. *J Neurosci* 27:4747–4755
- Rich EL, Shapiro M (2009) Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. *J Neurosci* 29:7208–7219
- Schmelzeis MC, Mittleman G (1996) The hippocampus and reward: effects of hippocampal lesions on progressive-ratio responding. *Behav Neurosci* 110:1049–1066
- Schwartz RK (2009) Rodent models of serial reaction time tasks and their implementation in neurobiological research. *Behav Brain Res* 199:76–88
- Silveira JM, Kimble DP (1968) Brightness discrimination and reversal in hippocampally-lesioned rats. *Physiol Behav* 3:625–630
- Simonov PV (1974) On the role of the hippocampus in the integrative activity of the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 34:33–41
- Simonov PV (1991) Thwarted action needed—informational theories of emotions. *Int J Comp Psychol* 5(2):103–107
- Spanswick SC, Sutherland RJ (2010) Object/context-specific memory deficits associated with loss of hippocampal granule cells after adrenalectomy in rats. *Learn Mem* 17:241–245
- Tait DS, Brown VJ (2007) Difficulty overcoming learned non-reward during reversal learning in rats with ibotenic acid lesions of orbital prefrontal cortex. *Ann N Y Acad Sci* 1121:407–420
- Tam SK, Jennings DJ, Bonardi C (2015) Effects of dorsal hippocampal damage on conditioning and conditioned-response timing: a pooled analysis. *Hippocampus* 25:444–459
- Taylor JR, Robbins TW (1984) Enhanced behavioural control by conditioned reinforcers following microinjections of d-amphetamine into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 84:405–412
- Verwer RW, Meijer RJ, van Uum HF, Witter MP (1997) Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 7:397–402
- Wallace RJ, Tigner JC (1972) Effect of cortical and hippocampal lesions on hoarding behavior in the albino rat. *Physiol Behav* 8:937–942
- White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77:125–184
- White NM, Packard MG, McDonald RJ (2013) Dissociation of memory systems: the story unfolds. *Behav Neurosci* 127:813–834
- Wilkinson LS, Mittleman G, Torres E, Humby T, Hall FS, Robbins TW (1993) Enhancement of amphetamine-induced locomotor activity and dopamine release in nucleus accumbens following excitotoxic lesions of the hippocampus. *Behav Brain Res* 55:143–150
- Will JL, Eckart MT, Rosenow F, Bauer S, Oertel WH, Schwarting RKW, Norwood BA (2013) Enhanced sequential reaction time task performance in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy with classic hippocampal sclerosis. *Behav Brain Res* 247:65–72
- Wirth S, Ferry B, Di Scala G (1998) Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behav Brain Res* 91:49–59
- Wise SP, Murray EA (2000) Arbitrary associations between antecedents and actions. *Trends Neurosci* 23:271–276
- Wishart T, Brozman L, Mogenson G (1969) Effects of lesions of the hippocampus and septum on hoarding behaviour. *Anim Behav* 17:781–784
- Zhang WN, Bast T, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. *Behav Brain Res* 126:159–174



Decoupling Actions from Consequences: Dorsal Hippocampal Lesions Facilitate Instrumental Performance, but Impair Behavioral Flexibility in Rats

Sebastian Busse* and Rainer K. W. Schwarting

Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Tobias Kalenscher,
Heinrich-Heine University
Duesseldorf, Germany

Reviewed by:

José M. Delgado-García,
University Pablo de Olavide, Spain
Chantal Mathis,
Centre National de la Recherche
Scientifique, France

*Correspondence:

Sebastian Busse
bussese@staff.uni-marburg.de

Received: 21 March 2016

Accepted: 25 May 2016

Published: 08 June 2016

Citation:

Busse S and Schwarting RKW (2016)
Decoupling Actions from
Consequences: Dorsal Hippocampal
Lesions Facilitate Instrumental
Performance, but Impair Behavioral
Flexibility in Rats.
Front. Behav. Neurosci. 10:118.
doi: 10.3389/fnbeh.2016.00118

The present study is part of a series of experiments, where we analyze why and how damage of the rat's dorsal hippocampus (dHC) can enhance performance in a sequential reaction time task (SRTT). In this task, sequences of distinct visual stimulus presentations are food-rewarded in a fixed-ratio-13-schedule. Our previous study (Busse and Schwarting, 2016) had shown that rats with lesions of the dHC show substantially shorter session times and post-reinforcement pauses (PRPs) than controls, which allows for more practice when daily training is kept constant. Since sequential behavior is based on instrumental performance, a sequential benefit might be secondary to that. In order to test this hypothesis in the present study, we performed two experiments, where pseudorandom rather than sequential stimulus presentation was used in rats with excitotoxic dorsal hippocampal lesions. Again, we found enhanced performance in the lesion-group in terms of shorter session times and PRPs. During the sessions we found that the lesion-group spent less time with non-instrumental behavior (i.e., grooming, sniffing, and rearing) after prolonged instrumental training. Also, such rats showed moderate evidence for an extinction impairment under devalued food reward conditions and significant deficits in a response-outcome (R-O)-discrimination task in comparison to a control-group. These findings suggest that facilitatory effects on instrumental performance after dorsal hippocampal lesions may be primarily a result of complex behavioral changes, i.e., reductions of behavioral flexibility and/or alterations in motivation, which then result in enhanced instrumental learning.

Keywords: sequential learning, instrumental behavior, action/outcome, excitotoxic lesions, dorsal hippocampus, SRTT, declarative memory, rat

INTRODUCTION

It is our current understanding that memory can be divided into two main categories: declarative (memory of "what") and non-declarative memory (memory of "how"). Further division leads to distinct sub-categories of memory, e.g., procedural memory, which is a certain type of non-declarative memory. This psychological classification is paralleled by a neurobiological one, since declarative memory is linked to structures like the hippocampus,

whereas procedural memory is linked, among others, to basal ganglia function (McDonald and White, 1994). Both types of memory also require and partly share neocortical mechanisms. The scientific investigation of procedural learning and memory is based on specific tests, and one of the classical human ones is the serial (or sequential) reaction time task (SRTT; Nissen and Bullemer, 1987). In order to provide a translation of this task for rodents, we developed a SRTT in rats, where sequential instrumental nose-poking is reinforced under fixed-ratio conditions by food pellets (Domenger and Schwarting, 2006, 2007; for review, see Schwarting, 2009), using series of sequential stimuli which are identical to those used in typical research with humans (Nissen and Bullemer, 1987; Schwarting, 2009). Similar to what is known from patients with Parkinson's disease (Ferraro et al., 1993; Nagy et al., 2007; Carbon et al., 2010), our early studies had shown that striatal dopamine lesions led to behavioral deficits (Domenger and Schwarting, 2008; Eckart et al., 2010). In contrast, and rather surprisingly, lesions of the dorsal hippocampus (dHC) led to substantial improvements, that is, they actually boosted performance in the SRTT (Eckart et al., 2012; Will et al., 2013; Busse and Schwarting, 2016). Thus, in our first dHC lesion study, where we analyzed sequential learning and performance, we found that rats with excitotoxic dHC lesions showed clearly faster reaction times (RTs) and higher response accuracy (ACC) as compared to controls. The same animals had the expected deficits in an object-place recognition task. That is, they were impaired in a so-called episodic memory task, which is usually attributed to hippocampal mechanisms, but showed improved performance in a procedural task thought to reflect striatal function. Similar, but less procedural improvements were obtained in a subsequent study (Will et al., 2013), where hippocampal neuron loss was restricted to its CA3 and CA1 regions. This was achieved by a specific method of perforant pathway stimulation, a paradigm that produces hippocampal granule cell discharges over a prolonged period of subsequent electrical stimulation (Norwood et al., 2010).

We discussed the mechanisms underlying our earlier findings in terms of the multiple parallel memory hypothesis (White and McDonald, 2002), which postulates competition or even interference in information processing between striatum and HC (for review, see White et al., 2013). Neuroanatomical studies show that both structures receive inputs from various cortices and project back into the prefrontal cortex (Coutureau and Killcross, 2003; Killcross and Coutureau, 2003; McDonald et al., 2007; Tait and Brown, 2007; Gruber and McDonald, 2012), where their simultaneous inputs may interfere depending on the demands of the given task. In an instrumental learning task like the SRTT, where the need for spatial information processing is greatly reduced due to the rather limited spatial arrangement of stimuli and reward delivery, loss of hippocampal interference may therefore facilitate required procedural learning processes.

Furthermore, lesion-induced loss of a direct or indirect hippocampal influence on the striatum is possible, since there are extensive connections between these structures (Groenewegen et al., 1987; McGeorge and Faull, 1989).

However, apart from anatomical data, evidence for such influence is sparse and inconclusive. To demonstrate such an influence on a behavioral level would require an analysis of goal-directed and habitual behavioral systems: prolonged training results in a transfer of behavioral control from goal-directed to stimulus-response (S-R) habit systems (Yin and Knowlton, 2006) and the hippocampal formation may influence this process. If this would be the case, performance changes, especially improvements, in tasks that require primarily procedural information processing (such as the SRTT) would be expected following lesions of the HC.

In our early studies (Eckart et al., 2012; Will et al., 2013), where we found such improvements, the daily duration of training was kept constant. This factor may have favored learning and performance in rats with dHC lesions, which, due to their faster performance, obtained more practice each day. In order to rule this factor out, we performed another study (Busse and Schwarting, 2016), where daily training was ended whenever the rats had achieved a fixed number of successful instrumental responses and thus rewards. Again, rats with dHC lesions had deficits in an object-place recognition task, showing their typical declarative deficits. In the SRTT, however, they showed shorter RTs than controls only during initial SRTT-training. Nevertheless, they completed their daily trials faster than controls, and this result was largely due to the fact that the lesion-group showed shorter post-reinforcement pauses (PRPs). Also, they had impaired extinction behavior in a subsequent extinction test where reinforcement was withheld.

These findings led us to assume that the performance improvement of rats with dHC lesions in the SRTT might not specifically be due to an effect on sequential behavior, but to an effect on instrumental behavior, which is underlying our task. In order to test this hypothesis, we performed the present study where dHC lesions were applied as before; however, the rats were now trained under conditions of pseudorandom, rather than sequential stimulus presentation. Also, we asked whether the performance improvement (i.e., shorter daily session time and reduced PRPs), which we had observed in our prior studies, could have been the result of a reduction of behaviors that are not relevant to the task. Therefore, we monitored various operant and non-operant behaviors over the course of SRTT-training. Additionally, we took into account the fact that disruption of structures within the above mentioned memory systems can result in an overall deficit in behavioral flexibility. This deficit can have either adverse or even beneficial effects depending on the given task (Wirth et al., 1998; Cheung and Cardinal, 2005; Ito et al., 2005). Based on our recent findings, we assumed that damage to the dHC might result in a faster transition of goal-directed behavior into habitual behavior, which could explain the observed procedural performance facilitation, as well as the changes in behavior during the instrumental task. If this would be the case, dHC-ablated rats should show deficits in behavioral flexibility, as well as lesser awareness of response-outcome (R-O)-relationships.

To analyze these facets, we examined extinction behavior under devalued reward-conditions, and behavioral flexibility when confronting rats with a R-O-dissociated version of the SRTT.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Maintenance

Forty-one male Wistar rats (Harlan Laboratories GmbH, Netherlands), weighing 250–274 g on the day of surgery, were used and they served in two distinct experiments (Experiment 1: $n = 25$; Experiment 2: $n = 16$). Animals were housed individually and had *ad libitum* access to water (room temperature: 21–25°C; 31–47% humidity; 12:12 h light/dark cycle). Prior to surgery, the animals were handled for three consecutive days (5 min each per day). The experiments were conducted in accordance with the ethical regulations for animal experimentation at the Philipps-University of Marburg and were approved by the German animal welfare authorities (Regierungspräsidium Gießen).

Surgery

Surgery was performed similarly to our previous study: animals were anesthetized with isoflurane (Baxter Deutschland GmbH, Germany) and coordinates from bregma, as well as injection volumes for dHC lesion were identical to our previous study (for details, see Busse and Schwarting, 2016). Ibotenic acid and saline injections were made using a home-made injection system with a 1 μ l SGE syringe (SGE Analytical Science), that was connected via polyethylene tubing (0.38 mm \times 1.09 mm diameter; Plastics One Inc., VA, USA) to the injection cannula (gauge 26, Plastics One Inc., VA, USA). In order to allow the ibotenic acid or saline to diffuse, the syringe was kept in place for about 1–2 min after each injection (Busse and Schwarting, 2016).

Experiment 1

The lesion-group ($n = 11$) was injected with ibotenic acid (10 mg/ml in 0.1 M phosphate-buffered saline; RandD Systems GmbH, Germany). For sham-surgery ($n = 6$) only phosphate-buffered saline was injected and control animals ($n = 8$) underwent no surgical treatment.

Experiment 2

Only two groups were used (lesion-group: $n = 9$; control-group: $n = 7$), which underwent the same procedures as the respective groups in Experiment 1.

In both experiments, 14 days of recovery time were given after the surgery.

SRTT

During SRTT-shaping and -training, the animals received food only during (food pellets, see below) and directly after daily instrumental sessions (Altomin rat chow; Altrumin, Germany). After each session, they were fed individually (according to their body weight) with weighted portions of Altomin chow, which assured that all rats maintained 80–85% of their free feeding weight.

For SRTT-training and testing (for details, see Domenger and Schwarting, 2008; Eckart et al., 2012), we used modified operant chambers (MedAssociates Inc., UK) with four LED-equipped holes (i.e., nose-poke holes) arranged in a small recess in a semi-elliptic way tilted towards the pellet-receptacle (photographs of the set-up can be found in Schwarting, 2009). The holes were numbered as follows: (1) upper left; (2) upper right; (3) bottom left; (4) bottom right. The pellet-receptacle was connected to a dispenser, which delivered adjustable pellet amounts (dustless precision pellets, 45 mg each; Bioserve, Bilaney Consultants, Germany). During the training session, the animals had to respond to visual stimuli by poking into the illuminated (i.e., active) hole. After a correct response, the light was immediately lit in another hole. The order of the illuminated holes was either pseudorandom (i.e., holes were illuminated randomly, but the same hole was never lit twice in a row) or followed a 12-item-sequence (3-2-4-1-3-4-2-1-2-3-1-4; second-order conditional sequence, for details, see Reed and Johnson, 1994). In order to ensure dissociation of sequence and reinforcement, the food reward was delivered after each 13th correct response (fixed ratio schedule of 13; FR-13).

Shaping

Similar to our previous studies (Eckart et al., 2012; Busse and Schwarting, 2016), the animals were trained daily for 20 min each during a 6–7 day long phase until they reached the criterion of FR-13. After an incorrect poke (i.e., a poke into one of the non-lit holes) two discriminative stimuli were presented: a bright light (house light) and a high-pitched tone (duration: 2 s). After the criterion of FR-13 was reached, a 5 s time limit for poking was applied (termed omission).

SRTT-Analysis

All pokes into any non-lit hole were termed “incorrect pokes” (exception: two pokes into the same nose-poke hole within 1 s), while all pokes into the lit hole within the 5 s time limit were termed “correct pokes”. Response ACC was derived from the percentage of correct pokes from the number of total pokes. For RT analysis, only correct pokes on FR positions 2–13 were used. RT values on FR position 1 revealed the PRP, which describes the period between reward delivery and the following first nose-poke of the next FR-run. The time required to complete the 20 FR-13 runs per trial was termed session time (for details, see Busse and Schwarting, 2016).

Behavioral Recordings

All trials were recorded on video (cameras: “Nadelöhr Super Mini Kamera”, Abus, Germany; video capture device: “4 Kanal Digitalrekorder”, Abus, Germany) from two different angles (bird’s-eye view and view from the backside towards the food receptacle) inside the modified operant chambers. The recordings were analyzed visually by a trained observer who was blind to group assignments. Training days 1 and 15 of the pseudorandom stimulus presentation period were used to compare lesion- and control-group. Five different

behavioral measures were taken: inactivity, grooming, rearing, sniffing, and operant behavior. (1) Inactivity was defined as the time span during which the animals were neither performing the task, nor showing any distinct movement or any other of the following behaviors. (2) Grooming periods consisted of respective movements directed to the face, snout, and/or torso. (3) Sniffing behavior was defined as a distinct movement of the snout and vibrissae lasting for at least 2 s. (4) Rearing behavior was characterized by the rats standing up on the two hind limbs either on- or off-wall (including the operant chamber wall). (5) Operant behavior was defined as the time period in which the rats were performing the given task. The time periods of all distinct behaviors were quantified in total [s].

Specific Testing

Experiment 1

SRTT-training

Using the FR-13 schedule with pseudorandom stimulus presentation, the animals were trained daily for an amount of 20 complete FR-13 runs, i.e., the number of reinforced runs was identical between subjects, whereas depending on speed and/or ACC of each subject, the test duration differed. Training proceeded until all groups showed stable levels of performance in terms of no further significant changes in RT, ACC, or session time over three consecutive days. This level was reached after 17 days of training.

Random-sequence test

On day 17, stimulus presentation was switched to the sequential 12-item-sequence for 6 more days of training in order to find possible performance improvements that usually occur under sequential conditions.

Devaluation-extinction-test

On day 23, the devaluation-extinction-test was conducted. Here, the previous sequential 12-item-sequence with an FR-13 schedule was used. Unlike during SRTT-training, the amount of FR-13 runs to complete was not limited. During the trial, the food dispenser was disconnected, so that it could not produce acoustic cues, which it normally produces after each 13th correct poke. Furthermore, no omission was used and a discriminative stimulus (house-light/tone) was only given after an incorrect poke. A non-devalued extinction-test in our prior study revealed significant impairments in extinction behavior after dHc lesion (Busse and Schwarting, 2016). In order to rule out that this impairment was caused by differences in the hedonic outcome of the food reward, we satiated all animals before the extinction-test in the present study. On the day before the test, all animals received 50 g of dustless precision pellets in addition to their normal amount of food pellets. This food remained in the cages until the test was conducted on the following day, which provided all animals with unrestricted access to food prior to extinction-testing (see Rossi and Yin, 2012). Animals were weighed every day

and a significant weight gain on the day of the extinction-test in comparison to the day before confirmed that the pre-feeding was successful (mean weight gain = 30.64 ± 1.18 g; repeated measures ANOVA effect factor days: $F_{(1,22)} = 616.085$; $p < 0.001$; no group difference was found). Our previous study (Busse and Schwarting, 2016) also showed that animals would not abruptly cease poking when no food reward was delivered, but rather gradually reduce performance and show fewer responses, as well as longer pauses between pokes over time. In order to factor in this behavioral pattern, the program ended automatically if an animal had ceased poking for at least 3 min (cut-off), whereas any nose-poke (wrong or correct) before the cut-off would reset this timer. The total time until the cut-off (session time) and the amount of completed sequences were analyzed and compared between groups.

Experiment 2

SRTT-training

The training period was identical to that of Experiment 1, with the exception that only pseudorandom sequences were presented. A stable level of performance in terms of no further significant changes in RT, ACC, or session time over three consecutive days was reached after 18 days of training.

Response-Outcome-Dissociation

After completion of the SRTT-training period, the animals were tested again under the same pseudorandom 12-item-sequence with an FR-13 schedule. However, when eight full sequences were completed, the food reward was decoupled from the actions of the animal. Instead of delivering the food pellets after 13 correct pokes, the food reward was given automatically every 31.5 s and independent of the rat's activities. Starting 1.5 s after food delivery, the 12-item-sequence was started and the animal could poke freely into each hole as before for a period of 30 s until the next food reward was given. Immediately after eight more food rewards (i.e., 252 s) had been ejected into the receptacle (16th reward overall), the program switched back to the normal FR-13 schedule where nose-pokes and food reward were coupled, that is, rewards depended on the animals actions again. After eight more completed sequences, the program switched a second time to a phase in which actions and food reward were decoupled (24th reward overall). After the 32th ejection of food pellets into the receptacle, the program stopped automatically. In summary, this program consisted of four phases: C1 (R-O-[c]oupled), D1 (R-O-[d]ecoupled), C2 (R-O-[c]oupled), and D2 (R-O-[d]ecoupled). All phases ended after the 8th reward, but the length of each C-phase was variable since it depended on the animal's actions, while each D-phase lasted for 252 s. In total, 32 food rewards were given per training session. This test was repeated on 10 consecutive days. Since the durations of both C-phases were variable, whereas those of both D-phases were fixed, we calculated the amount of pokes per second (PPS; correct and incorrect pokes) to provide a comparable measure of performance.

Histological Analysis

At the end of both experiments, the rats were deeply anesthetized with sodium-pentobarbital (Release 300 mg/ml, WDT, Germany) and perfused transcardially with 0.9% saline and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed, post-fixed and cryo-protected (4% paraformaldehyde—30% sucrose solution, homemade). Coronal sections of 50 μm were cut on a cryostat (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Germany). Every fourth slice was mounted on a glass slide and stained with cresylviolet. Planimetric measurement was used in order to quantify the cross-sectional area of the HC for all 22 brains using an Axio Imager.M2 microscope (Zeiss, Germany) with a magnification of 2.5 \times (Eckart et al., 2012; Busse and Schwarting, 2016).

For each brain, the area (μm^2) of the remaining intact hippocampal tissue (CA1–3 fields, dentate gyrus; excluding the subiculum) in both hemispheres was traced manually with Stereo Investigator 9 (MicroBrightField Inc., VT, USA). Area values for each hemisphere were summed and then multiplied with slice thickness, which resulted in the estimated hippocampal tissue volumes (mm^3). For analysis, estimated volumes from control- and sham-group were defined as baseline (100%) and compared with the respective lesion-group (Busse and Schwarting, 2016).

Statistical Analysis

SPSS (Version 21.0) was used for all statistical tests, while statistical power analysis was conducted with G*Power (Version 3.1). Kolmogorov-Smirnov tests for all data revealed normal distribution; therefore, only parametric tests were used (ANOVAs and Tukey-corrected *post hoc* tests). Greenhouse-Geisser-correction was used when violations of sphericity were present. *P*-values were defined as follows: <0.05 significant; ≤ 0.1 trend; >0.1 no difference. All results are expressed as Mean \pm SEM.

RESULTS

Hippocampal Tissue Reduction

Analysis of the stained brain tissue revealed extensive damage of the dHC in all lesion-group animals. Additionally, dorsal subiculum and intermediate HC displayed minor damage, while damage of the neocortex was only visible near the injection tracts. Analysis of brain tissue from the sham-group (Experiment 1) revealed no gross damage of the HC. The observed tissue damages were comparable to our previous study (Busse and Schwarting, 2016).

The quantitative histological analysis of the 25 brains obtained at the end of Experiment 1 revealed significant hippocampal volume reductions ($F_{(2,22)} = 275.077$; $p < 0.001$) in the lesion-group as compared to controls (left: $-57.06 \pm 4.71\%$, right: $-58.76 \pm 6.7\%$). Reductions of hippocampal volume in sham-operated animals were small and did not differ significantly from controls (left: $-13.64 \pm 16.80\%$, right: $-7.58 \pm 11.79\%$).

The respective analysis of the 16 brains from Experiment 2 also revealed significant hippocampal volume reductions

($F_{(1,14)} = 280.999$; $p < 0.001$) in the lesion-group as compared to controls (left: $-42.80 \pm 2.14\%$, right: $-52.81 \pm 2.49\%$).

Behavioral Results—Experiment 1

Pseudorandom Stimulus Presentation

Statistical analysis showed that RTs of the correct pokes (Figure 1A) decreased and became asymptotic in all groups (repeated measurement factor days: $F_{(3,624,79,731)} = 94.971$; $p < 0.001$). Further statistical tests revealed a significant group difference ($F_{(2,22)} = 8.687$; $p = 0.002$) and interaction between groups and training days ($F_{(7,248,79,731)} = 4.126$; $p = 0.001$). Subsequent *post hoc* tests showed longer RTs in the sham-group as compared to lesion ($p = 0.001$) or control ($p = 0.02$), which did not differ from each other.

ACC (Figure 1B) increased over the pseudorandom training period in all three groups (factor days: $F_{(5,868,129,105)} = 26.715$; $p < 0.001$) and reached $\sim 90\%$ correct pokes on training day 13. No significant group difference or interaction between training days and groups was found.

Session time (Figure 1C) decreased in all three groups (factor days $F_{(5,140,113,091)} = 18.511$; $p < 0.001$). A significant group effect ($F_{(2,22)} = 13.042$; $p < 0.001$) and an interaction between training days and groups ($F_{(10,281,113,091)} = 2.031$; $p = 0.035$) were found. *Post hoc* tests revealed longer session times in the sham-group as compared to control- ($p = 0.019$), or lesion-group ($p < 0.001$).

Comparison of PRPs (Figure 2) between groups during pseudorandom stimulus presentation showed a significant effect on factor training days ($F_{(5,375,118,254)} = 8.231$; $p < 0.001$) and an interaction between training days and groups ($F_{(10,750,118,254)} = 2.978$; $p = 0.002$). Furthermore, a significant group effect was found ($F_{(2,22)} = 13.755$; $p < 0.001$) and *post hoc* tests revealed significant shorter PRPs in the lesion-group as compared to sham ($p < 0.001$) or control ($p = 0.048$). Descriptively, control- and sham-group showed an increase in PRPs over the course of the first 6–9 training days and then remained on a stable level until day 16, while the lesion-group showed stable low levels of PRPs throughout the 16 days of training.

Sequential Stimulus Presentation

Starting on day 17, pseudorandom stimulus presentation was switched to sequential stimulus presentation (see black vertical line in Figures 1, 2). No statistical significant reduction in RT (Figure 1A) was found during this six-day training period, but similar to the previous pseudorandom phase, a significant group difference was revealed ($F_{(2,22)} = 4.109$; $p = 0.03$), that is, longer RTs in the sham-group as compared to the lesion- ($p = 0.036$) and a trend as compared to the control-group ($p = 0.056$).

No statistical differences were found in ACC during this sequential testing period. Also, no significant change (factor days) in session time was found, but the interaction between training days and groups showed a trend ($F_{(3,940,43,340)} = 2.521$; $p = 0.056$). Furthermore, a significant group difference was found ($F_{(2,22)} = 7.843$; $p = 0.003$). *Post hoc* tests revealed longer

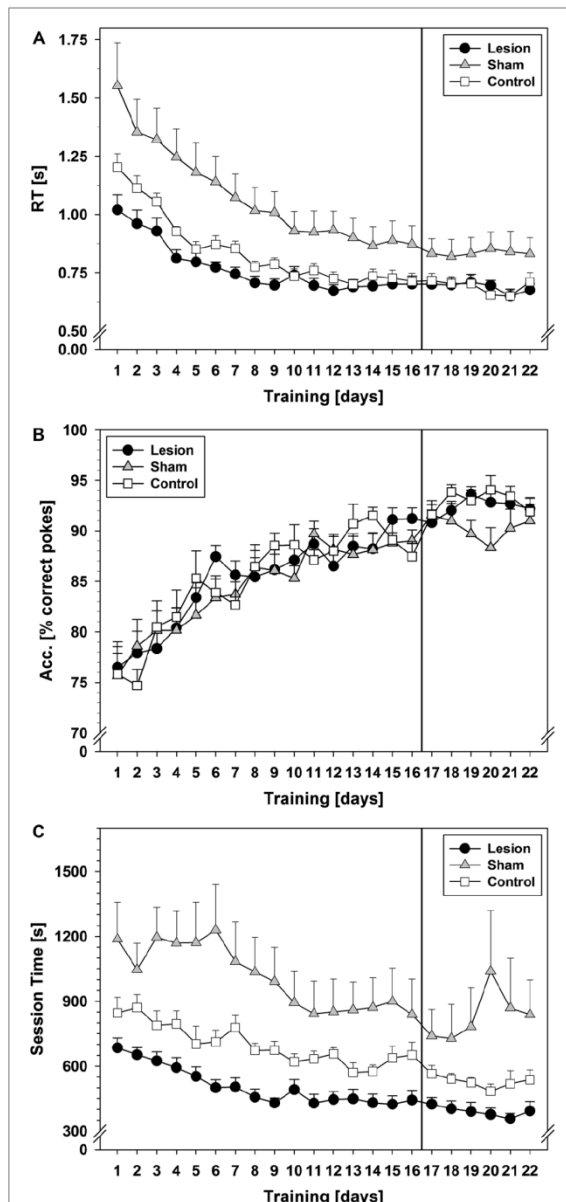


FIGURE 1 | SRTT data from Experiment 1. The vertical line indicates the switch from pseudorandom to the subsequent sequential stimulus presentation. **(A)** Reaction times (RTs) in seconds during the 22-day training period. **(B)** Response accuracy (ACC) during the 22-day training period in terms of mean % of correct pokes. **(C)** Session times during the 22-day training period in seconds. Each data point reflects the mean of 20 successful fixed ratio schedule of 13 (FR-13) runs (\pm SEM). For statistical details see text.

session times in the sham-group as compared to lesion-group ($p = 0.002$), but no statistical difference between lesion and control.

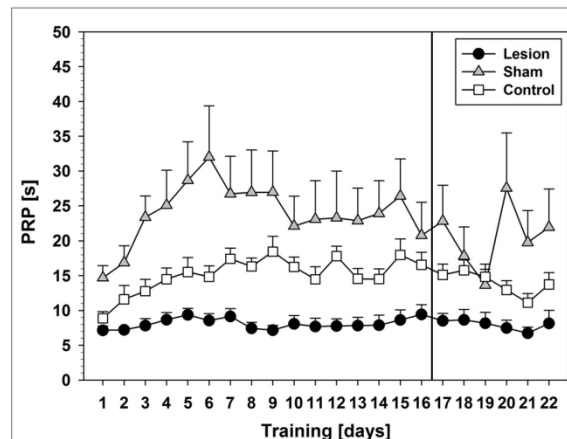


FIGURE 2 | Post-reinforcement pauses (PRPs) from Experiment 1 (Mean \pm SEM). The vertical line indicates the switch from pseudorandom to subsequent sequential stimulus presentation. For statistical details see text.

Comparison of PRPs between groups during sequential stimulus presentation showed a significant effect of the factor training days ($F_{(3,246,71,404)} = 3.901$; $p = 0.010$) and an interaction between training days and groups ($F_{(6,491,71,404)} = 4.497$; $p < 0.001$). Additionally, a significant group effect was found ($F_{(2,22)} = 7.743$; $p = 0.003$) and *post hoc* tests revealed significantly shorter PRPs in the lesion-group as compared to shams ($p = 0.002$), but not as compared to controls. Descriptively, control- and sham-group showed a decrease in PRP lengths, while the lesion-group still showed similar lengths of PRPs as during pseudorandom stimulus presentation.

Pseudorandom vs. Sequential Order

To test for possible differences between the two test phases, we computed means of the 6 days of sequential stimulus presentation and compared them with the respective means of the preceding 6 days of pseudorandom stimulus presentation (Table 1). This analysis yielded a significant difference in RTs between both phases ($F_{(2,22)} = 14.432$; $p = 0.001$), that is, shorter RTs during sequential stimulus presentation, and an interaction between phases and groups ($F_{(2,22)} = 4.183$; $p = 0.029$). A significant group difference was present ($F_{(2,22)} = 5.011$; $p = 0.016$), but *post hoc* testing revealed only smaller RTs in the lesion-group compared to shams ($p = 0.016$). Analysis of ACC showed an increase in correct pokes during sequential stimulus presentation (factor phases: $F_{(2,22)} = 34.040$; $p < 0.001$), but no interaction and no group difference. Session time decreased under sequential stimulus presentation (factor phases: $F_{(2,22)} = 11.322$; $p = 0.003$), but no interaction was found. However, a group difference was present ($F_{(2,22)} = 8.868$; $p = 0.001$) and *post hoc* testing revealed shorter session times in the lesion-group compared to shams ($p = 0.001$), but no difference between lesion- and control-group. PRPs decreased during sequential stimulus presentation (factor phases: $F_{(2,22)} = 6.479$; $p = 0.018$) and a group difference ($F_{(2,22)} = 9.528$;

TABLE 1 | Comparison of pseudorandom and sequential stimulus presentation.

	Pseudorandom stimulus presentation	Sequential stimulus presentation
Response accuracy (ACC in %)		
Lesion	89.04 ± 1.09	92.36 ± 0.76
Control	88.98 ± 1.04	92.97 ± 0.67
Sham	88.57 ± 1.13	90.31 ± 1.28
Reaction time [s]		
Lesion	0.69 ± 0.03	0.69 ± 0.09
Control	0.73 ± 0.03	0.69 ± 0.08
Sham	0.90 ± 0.08	0.84 ± 0.17
Session time [s]		
Lesion	436.81 ± 39.26	390.56 ± 33.12
Control	621.13 ± 35.49	528.18 ± 26.69
Sham	860.34 ± 137.70	832.68 ± 173.82
Post-reinforcement pause [s]		
Lesion	8.21 ± 1.23	7.96 ± 1.28
Control	15.99 ± 1.29	13.93 ± 0.96
Sham	23.38 ± 4.97	20.58 ± 4.71

Mean values of reaction time (RT), response accuracy (ACC), session time and post-reinforcement pauses (PRPs) from the last 6 days of pseudorandom stimulus presentation and the subsequent 6 days of sequential stimulus presentation are shown (Mean ± SEM).

$p = 0.001$), but no interaction, was found. *Post hoc* analysis revealed shorter PRPs in the lesion-group compared to the sham-group ($p = 0.001$), but not between controls and lesion-group.

Devaluation-Extinction-Test

Descriptively, the lesion-group completed more sequences and took longer until it reached the cut-off criterion, which was used as a measure of extinction (Figure 3). The statistical analysis, however, yielded only trends for differences between groups (extinction total time: $F_{(2,22)} = 3.080$; $p = 0.066$; completed sequences: $F_{(2,22)} = 3.215$; $p = 0.060$).

Behavioral Recordings and Analysis

This analysis was performed in order to get a better insight why session times and PRPs were substantially shorter in the lesion-group. We focused on the lesion-group in comparison to the control-group and summarized sniffing, grooming and rearing behavior under the category “non-operant behavior” for a more conclusive view.

Video analysis of behavior of the session times showed similar behavioral patterns on day 1 of the SRTT-training in lesion- and control-group: both groups showed no statistical difference in inactivity and non-operant behavior. However, the lesion-group spent less time with operant behavior (lesion: 546.96 ± 33.85 s; control: 685.63 ± 58.71 s; group difference: $F_{(1,17)} = 4.745$; $p = 0.044$). These patterns diverged over the course of training: descriptively, inactivity decreased in both groups, but only the lesion-group showed a statistical difference between day 1 and 15 ($F_{(1,20)} = 16.673$; $p = 0.001$). Operant behavior decreased in both groups and a statistical difference between day 1 and 15 was found (lesion: $F_{(1,20)} = 16.046$; $p = 0.001$; control:

$F_{(1,14)} = 7.488$; $p = 0.016$). Non-operant behavior decreased only in the lesion-group ($F_{(1,20)} = 7.477$; $p = 0.013$), while the control-group showed no difference between day 1 and 15. A significant group difference in non-operant behavior on day 15 was found ($F_{(1,17)} = 7.302$; $p = 0.015$). Changes in time spent with each behavior from day 1 to day 15 (%Δ) are shown in Figure 4.

Behavioral Results—Experiment 2

SRTT

Statistical analysis revealed that RTs of the correct pokes decreased over days and became asymptotic in both groups (factor days: $F_{(5,713,79,981)} = 27.726$; $p < 0.001$). The control-group showed slightly higher RTs at the beginning of the training period and greater inter-individual variability than the lesion-group (Figure 5A); however, there was no statistically significant group difference and no interaction between groups and days.

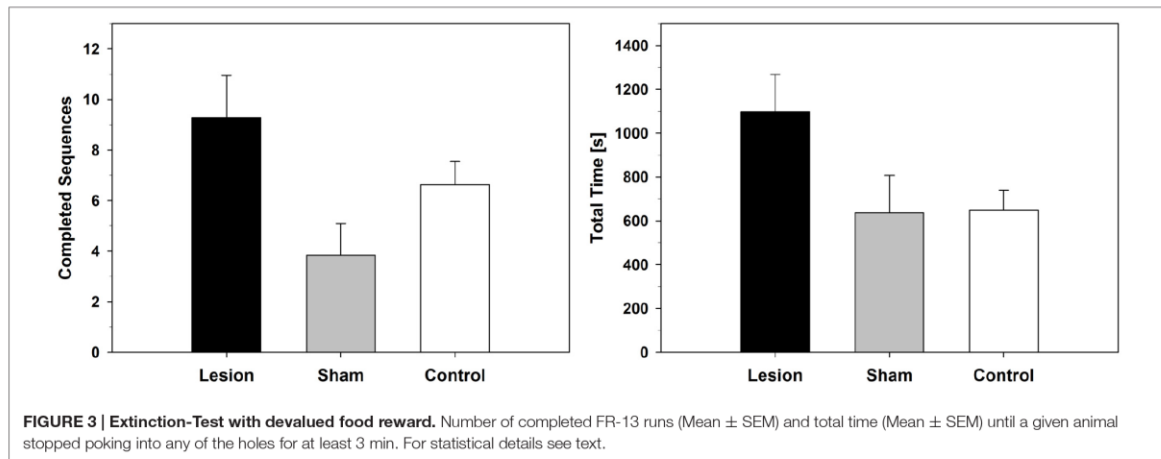
ACC increased during training in both groups (factor days: $F_{(4,911,68,761)} = 13.801$; $p < 0.001$). There was no significant difference between groups, but a trend for an interaction between groups and days ($F_{(4,911,68,761)} = 2.112$; $p = 0.075$). A stable level of performance was reached on day 16 in both groups (~90% correct pokes; Figure 5B).

Session time decreased in both groups over the training period (factor days: $F_{(3,954,55,357)} = 13.352$; $p < 0.001$). While the lesion-group showed a steady decrease in session time over 18 days, the control-group showed a much more shallow decrease (Figure 5C). Statistical analysis showed a significant group difference ($F_{(1,14)} = 4.874$; $p = 0.044$) and a trend for an interaction between the factor group and factor days ($F_{(3,954,55,357)} = 2.359$; $p = 0.065$).

Statistical analysis of PRPs revealed an effect on factor days ($F_{(17,238)} = 2.097$; $p = 0.008$) but only a trend in interaction between days and groups ($F_{(17,238)} = 1.615$; $p = 0.061$). Furthermore, a group difference was found, that is, shorter PRPs in the lesion-group ($F_{(1,14)} = 8.589$; $p = 0.011$). Unlike the lesion-group, the control-group showed an initial increase in PRPs (day 1–3). Thereafter, PRPs remained on a stable level throughout the rest of the training period (Figure 6).

Response-Outcome-Dissociation

On day 1 of this test, the control-group showed a saw-shape pattern of response, that is, fewer PPS during both R-O-decoupled phases (D1 and D2) as compared to those during the R-O-coupled phases (C1 and C2). The lesion-group showed fewer PPS during phase D1, but did not increase the amount of PPS in the subsequent C2-phase. From day 2 onwards until day 6 (data not shown in detail), the response pattern of the lesion-group resembled a sloping curve, with the greatest amount of PPS during the first phase, i.e., C1, and the least amount of PPS during the final phase, i.e., D2. In contrast, the response pattern of the control-group maintained the initially observed saw-shape. Starting on day 7, the lesion-group began to show signs of a saw-shape response pattern similar to the one observed in the control-group. Until the last day of testing, the response patterns of both groups aligned



more and more and on day 10 the lesion-group showed a similar response pattern to the one presented by the control-group (see **Figure 7** for three exemplary test days). Repeated measures ANOVAs for test days 1, 5 and 10, which were chosen for their evenly spaced chronological interval, yielded the following results: effects on factor phase were found on all 3 days (day 1: $F_{(3,42)} = 15.556$; $p < 0.001$; day 5: $F_{(3,42)} = 17.168$; $p < 0.001$; day 10: $F_{(1.993,27.900)} = 14.745$; $p < 0.001$), while an interaction between phases and groups was only found on day 1 ($F_{(3,42)} = 3.090$; $p = 0.037$). Group differences were only found on day 5 ($F_{(1,14)} = 11.305$; $p = 0.005$).

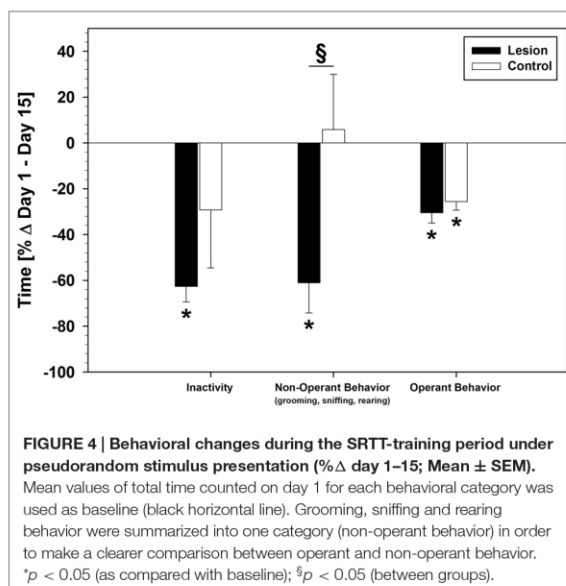
Also, we plotted the mean values of the daily completed sequences during phase D1 (**Figure 8**): The lesion-group

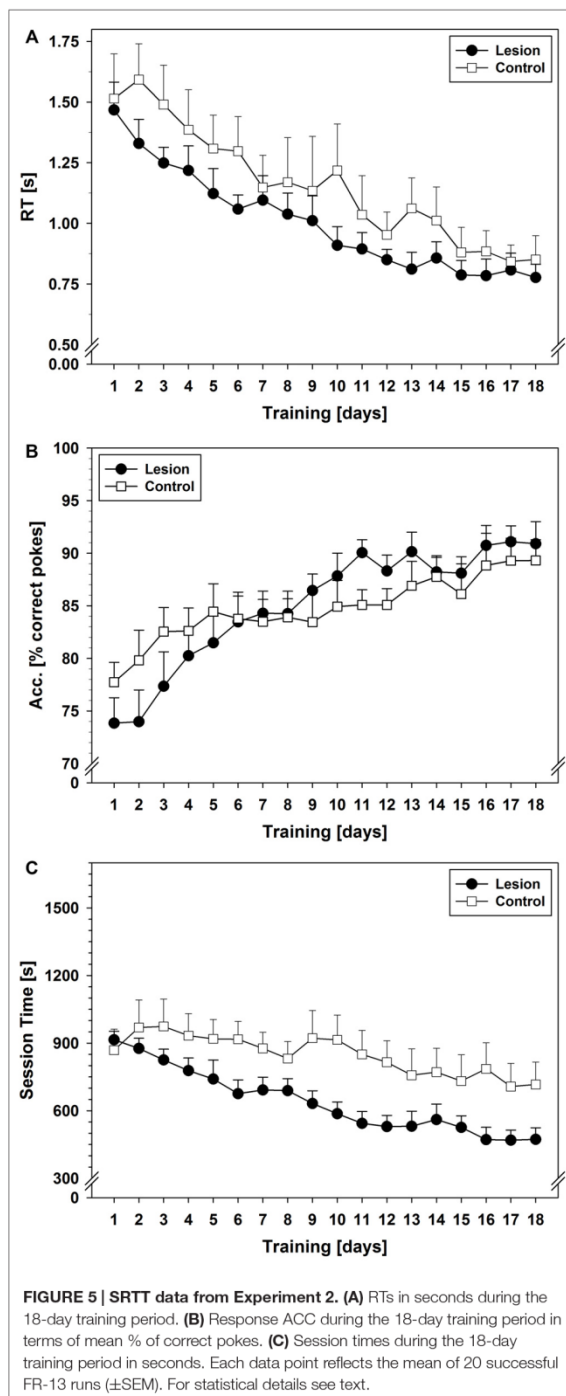
showed a clear bell-curve-like progression over 10 days, while the control-group completed similar and lower amounts of sequences in phase D1 throughout the testing period. Specific analysis of phase-D1 with separate repeated measures ANOVAs for each group revealed a change over days in the lesion-group ($F_{(9,72)} = 2.988$; $p = 0.004$), but not in the control-group.

DISCUSSION

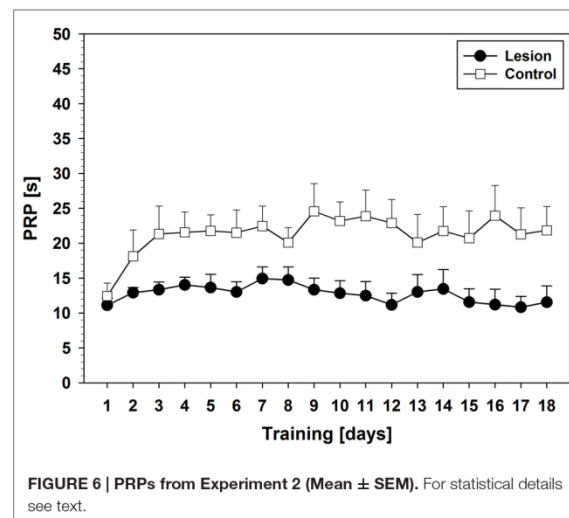
In this study, we provide evidence that dHC-ablated rats show enhanced instrumental performance under a FR-13 schedule with pseudorandom stimulus presentation. As in our prior study with sequential stimulus presentation (Busse and Schwarting, 2016), differences were found primarily in terms of shorter daily session times and shorter PRPs. In addition, a detailed video analysis showed that lesioned rats spent less time with operant behavior and simultaneously decreased non-operant behavior (grooming, sniffing, and rearing) over the course of the SRTT-training period. Furthermore, they showed impaired extinction behavior under devalued food reward conditions and, unlike controls, were apparently less able to discriminate between R-O-coupled and -decoupled task requirements.

The result of enhanced instrumental performance after dHC lesion appears counterintuitive at first sight, especially since deficits after complete or partial HC lesions are more common. These include deficits in spatial learning and memory (e.g., McDonald and White, 1994; Schroeder et al., 2002; Eckart et al., 2012; Busse and Schwarting, 2016), impairments in object recognition (Clarke et al., 2010), Pavlovian eyeblink conditioning (Gruart et al., 2006) and fear conditioning (McHugh and Tonegawa, 2009). However, findings on functional facilitation after HC lesions have also been reported, typically in avoidance tasks (Guillazo-Blanch et al., 2002; Wang et al., 2015), Pavlovian conditioning (Desmedt et al., 2003; Lee and Kim, 2004) and a variety of instrumental





tasks (Gallagher and Holland, 1992; Compton, 2004; Cheung and Cardinal, 2005; for review, see Schwarting and Busse, submitted). Therefore, the consequences of



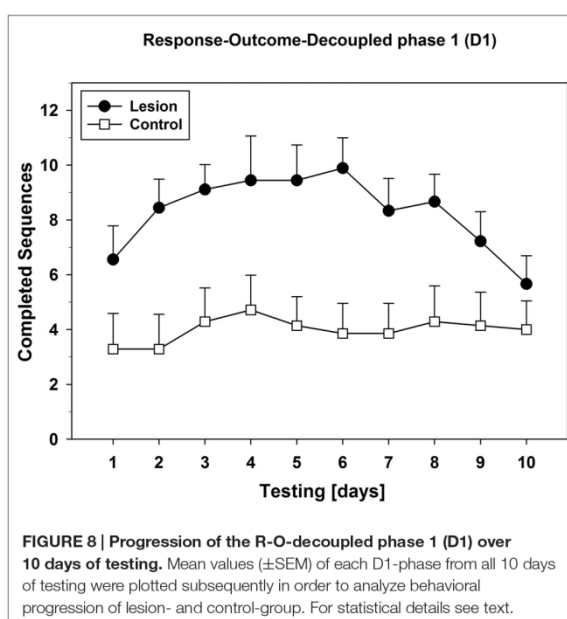
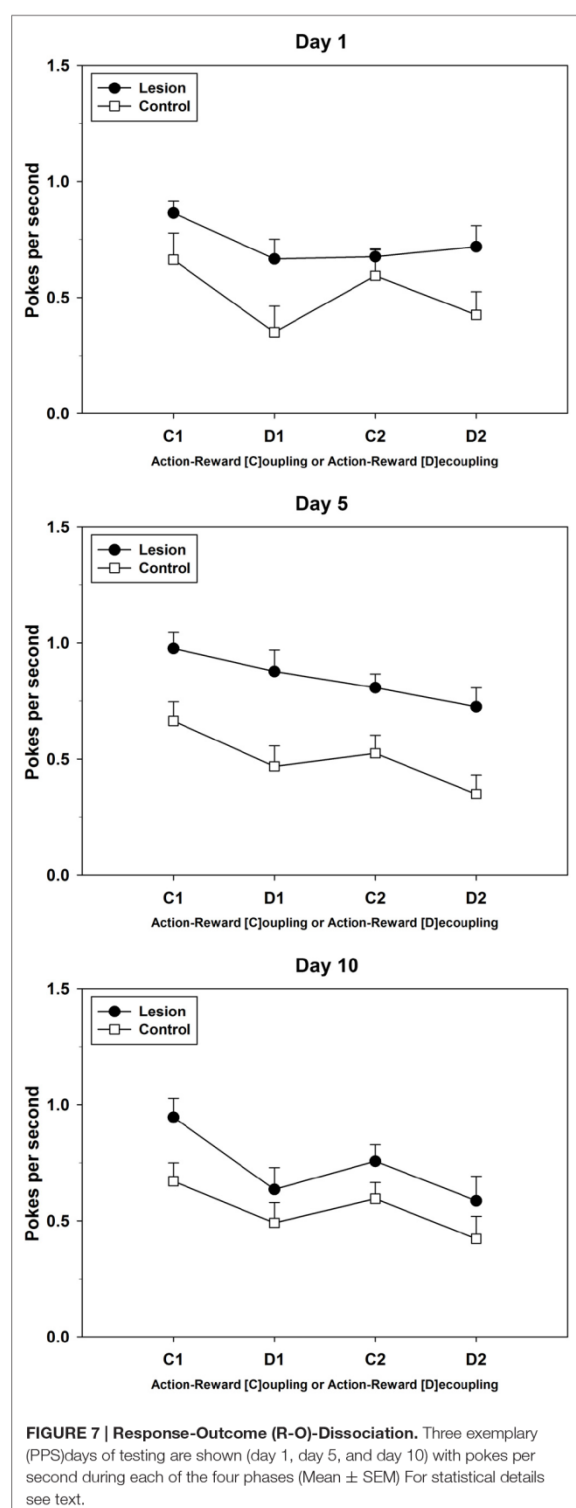
HC lesions seem to be highly depended on the given task requirements.

Histological Analysis

Hippocampal tissue reduction in the lesion-groups of both present experiments was similar to our previous studies where the same excitotoxic technique was used (Eckart et al., 2012; Busse and Schwarting, 2016), that is, the lesion led to a 40–60% loss of total hippocampal estimated volume, which mainly encompassed the dorsal HC and parts of the underlying intermediate HC, but spared the ventral part of the HC.

Sham-Operated Animals

The sham-treated animals of Experiment 1 showed longer RTs, daily session times and PRPs as compared to untreated controls, even though gross tissue damage due to the sham procedure was small and not statistically significant compared to controls. These findings are in line with our previous data that consistently showed worse instrumental performance in rats with sham lesions. Possible explanations for such sham effects are multifaceted: sham surgical procedures are known to cause neurochemical and behavioral changes, including mnemonic ones (Adams et al., 1994; Raghavendra Rao et al., 2000; Grossman et al., 2003; Hirshler et al., 2010). These may be due to various factors or their interactions, including anesthesia, skull surgery, cannula insertion, and saline injection. These may also have played a role in dHc-ablated animals, but performance facilitation by loss of hippocampal function may have overshadowed those effects. Sham-surgeries are generally very important in their function as a control, though in the context of our experiments the ambiguous behavioral changes only aggravated interpretation of our findings instead of providing a more clear understanding of lesion-induced facilitation of instrumental performance. Since we applied the exact same surgical procedures for both lesion- and sham-groups



over the course of four distinct experiments (see Eckart et al., 2012; Busse and Schwarting, 2016), with the only difference being the injected substance (ibotenic acid vs. saline), it was not possible for us to determine why the sham-groups performed so poorly overall. Therefore, the results from Experiment 1 led us to the decision to forgo an additional sham-operated group in Experiment 2.

SRTT

Results from the SRTT-training in both experiments were comparable and similar to our previous studies. All animals increased their response ACC towards $\sim 90\%$ correct pokes and decreased their RTs, as well as daily session times over the course of training. In Experiment 1, the lesion-group showed shorter RTs during the first days of training, but this difference vanished later around training day 10, at least in comparison to the control-group. In contrast, no such difference was found between control and lesioned rats in Experiment 2. This may be a result of the shaping phase that preceded the SRTT-training, where it is difficult to control for equal amounts of instrumental learning experience across all individual animals. Furthermore, the shaping phase in Experiment 1 lasted 7 days, while it took only 6 days to complete the shaping phase in Experiment 2. This one-day difference may have contributed to outcome differences between both experiments.

The lesion-group showed shorter daily session times in both experiments when compared to controls or sham-animals. This difference persisted throughout the training period. Interestingly, in Experiment 2, lesion- and control-group showed nearly identical daily session times on training day 1. Towards the end of the training period, however, these values had diverged

significantly with the lesion-group reducing daily session times further than the control-group.

PRP data showed similar curve shapes in both experiments, with lesion animals maintaining their shorter PRPs throughout the whole training period. The control- and sham-rats initially increased PRP times two- or three-fold in comparison to lesion rats. They then remained stable on this level until the end of training. These differences likely play a major role in the group disparity observed in daily session times.

Since hyperactivity has been reported in rats after HC lesions (Andersen et al., 2007), it is possible that such a factor could have contributed to the observed differences in session time and PRPs. In our earlier studies we found mild signs (i.e., a statistical trend) for hyperactivity, namely increased locomotor activity during the habituation phase of an object place recognition task (Eckart et al., 2012), in dHC-ablated rats. However, the RTs do not support such a conclusion since lesion- and control-groups showed no significant statistical difference in RT during both present experiments.

Pseudorandom vs. Sequential Stimulus Presentation

After switching from pseudorandom to sequential stimulus presentation on training day 17 in Experiment 1, we expected an increase in ACC and a decrease in RTs in all groups, and therefore, a decrease in daily session times. However, even though statistical significant improvements were found, the overall extent of a performance improvement by sequential stimulus presentation was surprisingly marginal. This was most likely the result of a ceiling effect, which may have prevented rats from improving their performance further. Since all animals reached their performance maximum after 16 days of training under this pseudorandom stimulus presentation, we adopted these findings in the design of our second experiment and used a pseudorandom stimulus presentation. This is comparable to the time span in our previous study where we used a sequential stimulus presentation (17 days of training until maximum performance). Overall, these results implied that the performance facilitation caused by dHC lesions is not specifically tied to sequential performance, but relates to an effect on instrumental performance in general.

Devaluation-Extinction-Test

Under extinction conditions with a devalued food reward, the lesion-group of Experiment 1 completed more FR-13 runs and showed longer session times. Descriptively, these data implicate impaired extinction behavior in the dHC-group, but the statistical analysis revealed only a trend for a difference between lesion- and sham/control-groups. A statistical power analysis showed that both findings had only medium effect sizes (total time: effect size $f = 0.529$; total sequences: effect size $f = 0.540$) and therefore a power below 0.8, which could explain the statistical trend results. Nevertheless, the descriptive findings are in line with our previous study, where we found impaired extinction under non-devalued

reward conditions in the dHC-group (Busse and Schwarting, 2016).

Both findings are in contrast to similar research from Corbit and Balleine (2000): they concluded in the first experiment of their study that dHC ablations had no effect on extinction behavior, since lesioned animals were as sensitive to instrumental outcome devaluation as sham-operated animals. However, it has to be noted that their procedures (fixed interval-20-schedule, two-day training period, two-choice task, electrolytic instead of excitotoxic lesions) differed substantially from the ones used in our study. Additionally, earlier studies have reported extinction impairments as a result of HC lesions in a variety of different learning tasks (avoidance tasks: Isaacson et al., 1961; Green et al., 1967; Tonkiss et al., 1990; Weiner et al., 1998; Guillaudo-Blanch et al., 2002; Pavlovian conditioning: Klüver, 1965; Schmaltz and Theios, 1972; instrumental tasks: Clark and Isaacson, 1965; Schmaltz and Isaacson, 1966; Brown et al., 1969; for review, see also Schwarting and Busse, submitted). It has also previously been shown that extensive instrumental training can lead to behavior that is initially goal-directed and mainly dependent upon the dorsomedial striatum (DMS) and then becomes habitual and largely dependent upon the dorsolateral striatum (DLS; Graybiel, 2008). Prolonged SRTT-training as it was used in our study most certainly led to a shift from R-O towards S-R behavior. The dHC lesions may have facilitated this process due to a change of direct or indirect HC interaction with the DMS and DLS. This could explain why an extinction impairment was present in our lesion-group, but not in the study from Corbit and Balleine (2000). Consequentially, the occurrence of impaired extinction behavior as a result of dHC lesions seems to be highly dependent on the given learning task and the amount of training that is provided.

Finally, we should address the question which factors might have determined extinction in our test, since extinction was not only characterized by the lack of reward, but also stimuli usually paralleling its delivery, namely sounds made by the food dispenser and the dropping food pellets. Thus, the differences between control and dHC-ablated rats may be due to reward omission, discontinuation of discriminative stimuli, or interactions between both. This limitation must be considered when interpreting these results.

Behavioral Recordings

Analysis of behavioral observations in Experiment 1 revealed another layer of the complex changes resulting from dHC ablations: while time spent with operant behavior during the session decreased in lesion- and control-group to a similar degree, non-operant behaviors (grooming, sniffing, and rearing) disappeared almost entirely in dHC-ablated rats. In contrast, intact rats pursued non-operant behaviors even after prolonged training, with no changes seen in the time spent from the first day of training in comparison to subsequent days. Differences seen in non-operant behavior contributed substantially to the divergence in daily session times between dHC-ablated and intact animals. It can be assumed that the reductions in non-operant behavior, as

well as the shorter PRPs, constituted the main behavioral alterations that led to the instrumental performance increase in the lesion-group. However, it is important to note that this performance increase may be only marginally, or not at all, related to actual strengthening of the instrumental learning process, but rather, to a state in which the dHC-ablated animals apparently had no other motivation than completing the instrumental task. Therefore, they exceeded controls and shams in performance. Such a motivational change may underlie several behavioral alterations in rats with hippocampal lesions: reports of decreased awareness for potentially aversive or distracting stimuli (Chudasama et al., 2008, 2009; Machado and Bachevalier, 2008), as well as diminished behavior driven by motivational states and internal needs, e.g., lack of frustration and “hesitation and doubt”, can be found throughout the hippocampal literature (Kimble, 1968; Coover et al., 1971; Isaacson and Kimble, 1972; Hirsh, 1974; Simonov, 1974, 1991; see also Schwarting and Busse, submitted).

Response-Outcome-Dissociation

In this test of Experiment 2, control-animals showed a clear ability to discriminate between the phases where rewards were dependent on their actions vs. those where they were not, since they decreased their nose-pokes during the decoupled phases leading to a saw-shape response pattern (Figure 7). This effect was observed starting from day 1 and lasted until the end of this testing period. In contrast, dHC-ablated rats did not only show higher rates of PPS but were apparently able to differentiate less between coupled and decoupled task phases. Similar patterns were observed on test day 5, whereas on test day 10, the lesion-group also showed decreased responding during the decoupled phases. Therefore, the dHC-lesioned animals displayed an initial impairment in the ability of correctly assessing the task requirements of each phase, while the control-group responded correctly right from the start. Further analyses of completed sequences during the first decoupled phase revealed that dHC-ablated rats showed a bell-curve-like progression of performance over 10 days of testing (Figure 8), which indicates S-R behavior up until test day 6. Since their initial behavior could be interpreted as indecisive on which instrumental strategy was best for the present task, the dHC-ablated rats displayed a clear habitual- instead of a goal-directed strategy after test day 2. This made them operate similarly during both R-O-task conditions and it resulted in higher PPS, as well as more completed sequences during the decoupled phases than the control-group. These findings indicate that the ability of correctly assessing task requirements was not lost completely, but it took much longer for the dHC-lesioned rats to use it and adapt their behavioral strategy, possibly because their behavior was largely determined by S-R rather than R-O mechanisms.

A similar effect on R-O-relations has been shown in the second experiment conducted in the study by Corbit and Balleine (2000), where intact animals pushed a lever less frequently for which the previously associated action-outcome

contingency had been degraded, as opposed to a second lever for which the previously established action-outcome contingency had been preserved. In comparison, rats with dHC lesions responded to both levers at equal rates. They concluded that this supports a specific interpretation of the role of the HC in declarative memory which states that the hippocampal formation is integral for the detection of the causal relationships between actions and outcomes (Squire and Zola, 1996; Wise and Murray, 2000) and that damage to the HC renders rats unable to differentiate between “actions that are causal with respect to their associated outcomes and those that are merely adventitiously related” (Corbit and Balleine, 2000).

Several possible interpretations can be drawn from the present results: firstly, the dHC may have direct or indirect influence on processes within the DMS or DLS, which are known to play a major role in the realization of R-O or S-R instrumental contingencies and strategies. Several studies have shown that the DMS is involved in R-O learning and prolonged behavioral training results in a transfer of behavioral control from R-O associations to S-R habit systems, which is believed to be mediated by the DLS (Adams and Dickinson, 1981; Yin et al., 2004, 2005; Daw et al., 2005; Yin and Knowlton, 2006). Ablation of dHC structures might disrupt these processes and result in a preferential or faster establishment of S-R behavior than in intact animals. Simultaneously, if hippocampal interaction with the DMS is, at least in part, a prerequisite for R-O associations, a reversal towards goal-directed behavior could be aggravated and would rely on prolonged exposure to the changed environment, i.e., different task conditions. In more general terms, the influence of the dHC could possibly inhibit or slow down transitions from goal-directed to habitual behavior under normal conditions. However, anatomical and behavioral data that support this idea are inconclusive: the DMS receives a wide array of inputs from different parts of the brain, e.g., prefrontal cortices, entorhinal cortex, subiculum, hippocampus, amygdala, thalamus, and piriform cortex (McGeorge and Faull, 1989; Voorn et al., 2004; Gruber and McDonald, 2012). Nonetheless, interplay between DMS and the hippocampal formation seems to be of particular interest since evidence shows that direct and indirect neuronal connections between both areas are rather complex and multi-layered. Studies by Krayniak et al. (1981) and Swanson and Köhler (1986) reported extensive projections from the entorhinal cortex, *inter alia*, into the DMS and nucleus accumbens. Furthermore, Groenewegen et al. (1987) were able to show that the subiculum, as the main output structure of the hippocampal formation, projects into many parts of the medial and ventral striatum. Expanding on the findings of McGeorge and Faull (1989) showed that the CA1 field of the HC also directly projects into the nucleus accumbens. Finally, projections from the dHC towards the posterior cingulate cortex, which itself projects strongly to the DMS, and projections from the ventral HC towards the medial prefrontal cortex, which then again projects into the DMS, have been reported by McGeorge and Faull (1989) in the same study.

In contrast, functional studies yielded ambiguous and nonspecific findings regarding interactions of the hippocampal formation and indirect sources of hippocampal input with the DMS and also other striatal regions (e.g., ventral striatum/nucleus accumbens). Lesions of brain regions that pass through inputs from the hippocampal formation to the DMS result in impairments in place learning, when rats are tested in the water maze task (Schenk and Morris, 1985; Sutherland et al., 1988; Kolb et al., 1994; Ferbinteanu et al., 1999), which makes it difficult to assess if any region of the hippocampal formation has preferential influence on the DMS. Additionally, DMS lesions also resulted in impairments in place learning, when rats were tested in a variant of this task, in which they had to adapt their behavior to a submerged platform that changed its position after every 8th trial. However, in contrast to dorsal or ventral HC-lesioned rats, animals with a DMS lesion still showed within-session improvements during this task (Ferbinteanu et al., 2003; McDonald et al., 2008). These data indicate that the DMS may play a role in response flexibility after animals are confronted with changes in the environment, especially regarding tasks in which spatial navigation is required, e.g., spatial reversal learning tasks (Castañé et al., 2010).

Secondly, loss of hippocampal function and therefore lesser impacts on other brain areas, e.g., prefrontal cortices, may strengthen pathways between DMS or DLS and prefrontal structures. This could have fastened transition into habitual behavior, caused by less competition or interference between declarative and non-declarative memory systems. This interpretation is supported by several studies and reviews that comprehensively analyzed behavioral changes after micro-injections into, or lesioning of different brain structures that are deemed part of the “multiple parallel memory systems” hypothesis (Mink, 1996; Packard, 1999; White and McDonald, 2002; McDonald et al., 2007; Gruber and McDonald, 2012).

Thirdly, damage to dorsal portions of the HC may have resulted in functional changes within the remaining areas of the hippocampal formation, i.e., ventral and intermediate HC. The hippocampal formation displays strong intrahippocampal connections (Amaral and Witter, 1989), which in return suggests mutual modulation of hippocampal sub-regions. It is firmly established that spatial learning and memory is more related to dHC structures, while modulation of sensorimotor processes is more related to ventral HC structures (Bast and Feldon, 2003; Chen et al., 2010; McHugh et al., 2011), but these anatomical and functional differences are expressed as a gradient along the septo-temporal axis and cannot be seen as distinct structures within the hippocampal formation. Furthermore, it has been shown that the intermediate HC is able to functionally compensate damage to dorsal and ventral HC structures (Bast et al., 2009; Bast, 2011). Although the intermediate portion of the hippocampal formation was still mainly intact in our lesioned animals, the extensive damage to the dHC may have resulted in alterations of downstream processing towards the remaining HC and striatal structures, which in return led to the observed behavioral changes.

It is important to note that none of these interpretations are exclusive and more comprehensive research regarding behavioral

alterations after damage to, or ablations of adjacent brain areas not directly associated with a given memory system, is necessary in order to provide further understanding of interactions between them. However, all of this evidence combined suggests that sensory input processing within the hippocampal formation may be closely linked with translation and contextualization of sensory information, towards and within the striatum and finally, with the resulting behaviors.

CONCLUSION

The data obtained in this study provide further evidence for an enhancing effect of dHC lesions on instrumental performance, that is, the previously found deficits in sequential behavior, were due to a more general deficit affecting instrumental behavior, rather than a specific sequential deficit. Still, the question of why and how damage to the hippocampal formation may result in beneficial behavioral changes in instrumental tasks needs to be raised, as it is functionally associated with declarative memory systems, whereas instrumental tasks, which are typically associated with non-declarative memory systems, are functionally tied to an anatomically distinct brain structure, i.e., the striatum. In our example, lesion of the dHC apparently led to facilitation of the behavioral shift from goal-directed to habitual behavior, which turned out to be a more effective strategy for the dHC-ablated rats in the present instrumental learning task. In return, dHC-ablated rats were impaired in the ability to adapt to a sudden change in the environment, i.e., the rules on how and when to obtain a food reward. Therefore, it took them much longer to reverse habitual back to goal-directed behavior. This suggests that information processing within the dHC may signal changes in the environment. By this means it can then take part in the decision on which instrumental behaviors should remain goal-directed and which can become habitual. Without it, instrumental behaviors may be prone to become habitual regardless of the environmental contingencies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SB and RKWS designed the study; SB performed surgery and behavioral experiments, RKWS supervised experiments; SB collected and analyzed data, RKWS supervised analysis; Both authors interpreted the data and discussed the results; SB wrote the manuscript, RKWS edited the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grant SCHW 559/12-1 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Janine Roscher and Janosch Beer for support in data acquisition and analysis, as well as Theresa Kisko for stylistic revision of the final manuscript.

REFERENCES

- Adams, C. D., and Dickinson, A. (1981). Instrumental responding following reinforcer devaluation. *Q. J. Exp. Psychol. Sec. B* 33, 109–121. doi: 10.1080/14640748108400816
- Adams, F. S., Schwarting, R. K., and Huston, J. P. (1994). Behavioral and neurochemical asymmetries following unilateral trephination of the rat skull: is this control operation always appropriate? *Physiol. Behav.* 55, 947–952. doi: 10.1016/0031-9384(94)90084-1
- Amaral, D., and Witter, M. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591. doi: 10.1016/0306-4522(89)90424-7
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., and O'Keefe, J. (2007). "Historical perspective: proposed functions, biological characteristics and neurobiological models of the hippocampus," in *The Hippocampus Book*, eds P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, and J. O'Keefe (New York, NY: Oxford University Press), 9–36.
- Bast, T. (2011). The hippocampal learning-behavior translation and the functional significance of hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 492–501. doi: 10.1016/j.conb.2011.01.003
- Bast, T., and Feldon, J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog. Neurobiol.* 70, 319–345. doi: 10.1016/s0301-0082(03)00112-6
- Bast, T., Wilson, I. A., Witter, M. P., Morris, R. G. M., and Rugg, M. D. (2009). From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol.* 7:e1000089. doi: 10.1371/journal.pbio.1000089
- Brown, T. S., Kaufmann, P. G., and Marco, L. A. (1969). The hippocampus and response perseveration in the cat. *Brain Res.* 12, 86–98. doi: 10.1016/0006-8993(69)90057-2
- Busse, S., and Schwarting, R. K. W. (2016). Procedural performance benefits after excitotoxic hippocampal lesions in the rat sequential reaction time task. *Neurotox. Res.* 29, 54–68. doi: 10.1007/s12640-015-9551-y
- Carbon, M., Reetz, K., Ghilardi, M. F., Dhawan, V., and Eidelberg, D. (2010). Early Parkinson's disease: longitudinal changes in brain activity during sequence learning. *Neurobiol. Dis.* 37, 455–460. doi: 10.1016/j.nbd.2009.10.025
- Castañé, A., Theobald, D. E., and Robbins, T. W. (2010). Selective lesions of the dorsomedial striatum impair serial spatial reversal learning in rats. *Behav. Brain Res.* 210, 74–83. doi: 10.1016/j.bbr.2010.02.017
- Chen, L. Y., Rex, C. S., Pham, D. T., Lynch, G., and Gall, C. M. (2010). BDNF signaling during learning is regionally differentiated within hippocampus. *J. Neurosci.* 30, 15097–15101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3549-10.2010
- Cheung, T. H. C., and Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci.* 6:36. doi: 10.1186/1471-2202-6-36
- Chudasama, Y., Izquierdo, A., and Murray, E. A. (2009). Distinct contributions of the amygdala and hippocampus to fear expression. *Eur. J. Neurosci.* 30, 2327–2337. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.07012.x
- Chudasama, Y., Wright, K. S., and Murray, E. A. (2008). Hippocampal lesions in rhesus monkeys disrupt emotional responses but not reinforcer devaluation effects. *Biol. Psychiatry* 63, 1084–1091. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.11.012
- Clark, C. V. H., and Isaacson, R. L. (1965). Effect of bilateral hippocampal ablation on DRL performance. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 59, 137–140. doi: 10.1037/h0021599
- Clarke, J. R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., and Delgado-García, J. M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 2652–2657. doi: 10.1073/pnas.0915059107
- Compton, D. M. (2004). Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behav. Processes* 67, 335–342. doi: 10.1016/j.beproc.2004.06.002
- Coover, G. D., Goldman, L., and Levine, S. (1971). Plasma corticosterone levels during extinction of a lever-press response in hippocampectomized rats. *Physiol. Behav.* 7, 727–732. doi: 10.1016/0031-9384(71)90140-5
- Corbit, L. H., and Balleine, B. W. (2000). The role of the hippocampus in instrumental conditioning. *J. Neurosci.* 20, 4233–4239.
- Coutureau, E., and Killcross, S. (2003). Inactivation of the infralimbic prefrontal cortex reinstates goal-directed responding in overtrained rats. *Behav. Brain Res.* 146, 167–174. doi: 10.1016/j.bbr.2003.09.025
- Daw, N. D., Niv, Y., and Dayan, P. (2005). Uncertainty-based competition between prefrontal and dorsolateral striatal systems for behavioral control. *Nat. Neurosci.* 8, 1704–1711. doi: 10.1038/nn1560
- Desmedt, A., Marighetto, A., Garcia, R., and Jaffard, R. (2003). The effects of ibotenic hippocampal lesions on discriminative fear conditioning to context in mice: impairment of facilitation depending on the associative value of a phasic explicit cue. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1953–1963. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02615.x
- Domenger, D., and Schwarting, R. K. W. (2006). The serial reaction time task in the rat: effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists. *Behav. Brain Res.* 175, 212–222. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.027
- Domenger, D., and Schwarting, R. K. W. (2007). Sequential behavior in the rat: role of skill and attention. *Exp. Brain Res.* 182, 223–231. doi: 10.1007/s00221-007-0987-z
- Domenger, D., and Schwarting, R. (2008). Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on performance in a rat sequential reaction time task. *Neurosci. Lett.* 444, 212–216. doi: 10.1016/j.neulet.2008.08.048
- Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., McDonald, R. S., and Schwarting, R. K. W. (2010). 6-Hydroxydopamine lesions in the rat neostriatum impair sequential learning in a serial reaction time task. *Neurotox. Res.* 17, 287–298. doi: 10.1007/s12640-009-9103-4
- Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., and Schwarting, R. K. W. (2012). Dorsal hippocampal lesions boost performance in the rat sequential reaction time task. *Hippocampus* 22, 1202–1214. doi: 10.1002/hipo.20965
- Ferbinteanu, J., Holsinger, R., and McDonald, R. J. (1999). Lesions of the medial or lateral perforant path have different effects on hippocampal contributions to place learning and on fear conditioning to context. *Behav. Brain Res.* 101, 65–84. doi: 10.1016/s0166-4328(98)00144-2
- Ferbinteanu, J., Ray, C., and McDonald, R. J. (2003). Both dorsal and ventral hippocampus contribute to spatial learning in Long-Evans rats. *Neurosci. Lett.* 345, 131–135. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00473-7
- Ferraro, F. R., Balota, D. A., and Connor, L. T. (1993). Implicit memory and the formation of new associations in nondemented Parkinson's disease individuals and individuals with senile dementia of the Alzheimer type: a serial reaction time (SRT) investigation. *Brain Cogn.* 21, 163–180. doi: 10.1006/brcg.1993.1013
- Gallagher, M., and Holland, P. C. (1992). Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus* 2, 81–88. doi: 10.1002/hipo.450020111
- Graybiel, A. M. (2008). Habits, rituals and the evaluative brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 359–387. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851
- Green, R. H., Beatty, W. W., and Schwartzbaum, J. S. (1967). Comparative effects of septo-hippocampal and caudate lesions on performance in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 64, 444–452. doi: 10.1037/h0025195
- Groenewegen, H. J., Vermeulen-Van der Zee, E., te Kortschot, A., and Witter, M. P. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 23, 103–120. doi: 10.1016/0306-4522(87)90275-2
- Grossman, R., Shohami, E., Alexandrovich, A., Yatsiv, I., Kloog, Y., and Biegon, A. (2003). Increase in peripheral benzodiazepine receptors and loss of glutamate NMDA receptors in a mouse model of closed head injury: a quantitative autoradiographic study. *Neuroimage* 20, 1971–1981. doi: 10.1016/j.neuroimage.2003.06.003
- Gruart, A., Muñoz, M. D., and Delgado-García, J. M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J. Neurosci.* 26, 1077–1087. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006
- Gruber, A. J., and McDonald, R. J. (2012). Context, emotion and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 6:50. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00050
- Guillazo-Blanch, G., Nadal, R., Vale-Martínez, A., Martí-Nicolovius, M., Arévalo, R., and Morgado-Bernal, I. (2002). Effects of fimbria lesions on trace two-way active avoidance acquisition and retention in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78, 406–425. doi: 10.1006/nlme.2002.4073
- Hirsh, R. (1974). The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav. Biol.* 12, 421–444. doi: 10.1016/s0091-6773(74)92231-7

- Hirshler, Y., Polat, U., and Biegon, A. (2010). Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Exp. Neurol.* 222, 42–50. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.12.006
- Isaacson, R. L., Douglas, R. J., and Moore, R. Y. (1961). The effect of radical hippocampal ablation on acquisition of avoidance response. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 54, 625–628. doi: 10.1037/h0047286
- Isaacson, R. L., and Kimble, D. P. (1972). Lesions of the limbic system: their effects upon hypotheses and frustration. *Behav. Biol.* 7, 767–793. doi: 10.1016/s0091-6773(72)80170-6
- Ito, R., Everitt, B. J., and Robbins, T. W. (2005). The hippocampus and appetitive Pavlovian conditioning: effects of excitotoxic hippocampal lesions on conditioned locomotor activity and autoshaping. *Hippocampus* 15, 713–721. doi: 10.1002/hipo.20094
- Killcross, S., and Coutureau, E. (2003). Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cereb. Cortex* 13, 400–408. doi: 10.1093/cercor/13.4.400
- Kimble, D. P. (1968). Hippocampus and internal inhibition. *Psychol. Bull.* 70, 285–295. doi: 10.1037/h0026470
- Klüver, H. (1965). Neurobiology of normal and abnormal perception. *Proc. Annu. Meeting Am. Psychopathol. Assoc.* 53, 1–40.
- Kolb, B., Buhrmann, K., McDonald, R., and Sutherland, R. J. (1994). Dissociation of the medial prefrontal, posterior parietal and posterior temporal cortex for spatial navigation and recognition memory in the rat. *Cereb. Cortex* 4, 664–680. doi: 10.1093/cercor/4.6.664
- Krainiak, P. F., Meibach, R. C., and Siegel, A. (1981). A projection from the entorhinal cortex to the nucleus accumbens in the rat. *Brain Res.* 209, 427–431. doi: 10.1016/0006-8993(81)90165-7
- Lee, T., and Kim, J. J. (2004). Differential effects of cerebellar, amygdala and hippocampal lesions on classical eyeblink conditioning in rats. *J. Neurosci.* 24, 3242–3250. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5382-03.2004
- Machado, C. J., and Bachevalier, J. (2008). Behavioral and hormonal reactivity to threat: effects of selective amygdala, hippocampal or orbital frontal lesions in monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 33, 926–941. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.04.012
- McDonald, R. J., Foong, N., Ray, C., Rizos, Z., and Hong, N. S. (2007). The role of medial prefrontal cortex in context-specific inhibition during reversal learning of a visual discrimination. *Exp. Brain Res.* 177, 509–519. doi: 10.1007/s00221-006-0699-9
- McDonald, R. J., King, A. L., Foong, N., Rizos, Z., and Hong, N. S. (2008). Neurotoxic lesions of the medial prefrontal cortex or medial striatum impair multiple-location place learning in the water task: evidence for neural structures with complementary roles in behavioural flexibility. *Exp. Brain Res.* 187, 419–427. doi: 10.1007/s00221-008-1314-z
- McDonald, R. J., and White, N. M. (1994). Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav. Neural Biol.* 61, 260–270. doi: 10.1016/s0163-1047(05)80009-3
- McGeorge, A., and Faull, R. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29, 503–537. doi: 10.1016/0306-4522(89)90128-0
- McHugh, S. B., Fillenz, M., Lowry, J. P., Rawlins, J. N. P., and Bannerman, D. M. (2011). Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. *Eur. J. Neurosci.* 33, 322–337. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07497.x
- McHugh, T. J., and Tonegawa, S. (2009). CA3 NMDA receptors are required for the rapid formation of a salient contextual representation. *Hippocampus* 19, 1153–1158. doi: 10.1002/hipo.20684
- Mink, J. W. (1996). The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.* 50, 381–425. doi: 10.1016/s0301-0082(96)00042-1
- Nagy, H., Keri, S., Myers, C. E., Benedek, G., Shohamy, D., and Gluck, M. A. (2007). Cognitive sequence learning in Parkinson's disease and amnesic mild cognitive impairment: dissociation between sequential and non-sequential learning of associations. *Neuropsychologia* 45, 1386–1392. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2006.10.017
- Nissen, M. J., and Bullemer, P. (1987). Attentional requirements of learning. Evidence from performance measures. *Cogn. Psychol.* 19, 1–32. doi: 10.1016/0010-0285(87)90002-8
- Norwood, B. A., Bumanglag, A. V., Osculati, F., Sbarbati, A., Marzola, P., Nicolato, E., et al. (2010). Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single “cryptic” episode of focal hippocampal excitation in awake rats. *J. Comp. Neurol.* 518, 3381–3407. doi: 10.1002/cne.22406
- Packard, M. G. (1999). Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 12881–12886. doi: 10.1073/pnas.96.22.12881
- Raghavendra Rao, V. L., Dogan, A., Bowen, K. K., and Dempsey, R. J. (2000). Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Exp. Neurol.* 161, 102–114. doi: 10.1006/exnr.1999.7269
- Reed, J., and Johnson, P. (1994). Assessing implicit learning with indirect tests: determining what is learned about sequence structure. *J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn.* 20, 585–594. doi: 10.1037/0278-7393.20.3.585
- Rossi, M. A., and Yin, H. H. (2012). Methods for studying habitual behavior in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* 8:8.29. doi: 10.1002/0471142301.ns08.29s60
- Schenk, F., and Morris, R. (1985). Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp. Brain Res.* 58, 11–28. doi: 10.1007/bf00238949
- Schmaltz, L. W., and Isaacson, R. L. (1966). The effects of preliminary training conditions upon DRL performance in the hippocampectomized rat. *Physiol. Behav.* 1, 175–182. doi: 10.1016/0031-9384(66)90065-5
- Schmaltz, L. W., and Theios, J. (1972). Acquisition and extinction of a classically conditioned response in hippocampectomized rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 79, 328–333. doi: 10.1037/h0032531
- Schroeder, J. P., Wingard, J. C., and Packard, M. G. (2002). Post-training reversible inactivation of hippocampus reveals interference between memory systems. *Hippocampus* 12, 280–284. doi: 10.1002/hipo.10024
- Schwartz, R. K. W. (2009). Rodent models of serial reaction time tasks and their implementation in neurobiological research. *Behav. Brain Res.* 199, 76–88. doi: 10.1016/j.bbr.2008.07.004
- Simonov, P. V. (1974). On the role of the hippocampus in the integrative activity of the brain. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 34, 33–41.
- Simonov, P. V. (1991). Thwarted action needed—informational theories of emotions. *Int. J. Comp. Psychol.* 5, 103–107.
- Squire, L. R., and Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 13515–13522. doi: 10.1073/pnas.93.24.13515
- Sutherland, R. J., Whishaw, I. Q., and Kolb, B. (1988). Contributions of cingulate cortex to two forms of spatial learning and memory. *J. Neurosci.* 8, 1863–1872.
- Swanson, L., and Köhler, C. (1986). Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *J. Neurosci.* 6, 3010–3023.
- Tait, D. S., and Brown, V. J. (2007). Difficulty overcoming learned non-reward during reversal learning in rats with ibotenic acid lesions of orbital prefrontal cortex. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1121, 407–420. doi: 10.1196/annals.1401.010
- Tonkiss, J., Feldon, J., and Rawlins, J. (1990). Section of the descending columns of the fornix produces delay- and interference-dependent working memory deficits. *Behav. Brain Res.* 36, 113–126. doi: 10.1016/0166-4328(90)90166-c
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., and Pennartz, C. M. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* 27, 468–474. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.006
- Wang, J., Bast, T., Wang, Y.-C., and Zhang, W.-N. (2015). Hippocampus ad two-way active avoidance conditioning: contrasting effects of cytotoxic lesion and temporary inactivation. *Hippocampus* 25, 1517–1531. doi: 10.1002/hipo.22471
- Weiner, I., Feldon, J., Tarrasch, R., Hairston, I., and Joel, D. (1998). Fimbria-fornix cut affects spontaneous activity, two-way avoidance and delayed non matching to sample, but not latent inhibition. *Behav. Brain Res.* 96, 59–70. doi: 10.1016/s0166-4328(97)00193-9

- White, N. M., and McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77, 125–184. doi: 10.1006/nlme.2001.4008
- White, N. M., Packard, M. G., and McDonald, R. J. (2013). Dissociation of memory systems: the story unfolds. *Behav. Neurosci.* 127, 813–834. doi: 10.1037/a0034859
- Will, J. L., Eckart, M. T., Rosenow, F., Bauer, S., Oertel, W. H., Schwarting, R. K. W., et al. (2013). Enhanced sequential reaction time task performance in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy with classic hippocampal sclerosis. *Behav. Brain Res.* 247, 65–72. doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.019
- Wirth, S., Ferry, B., and Di Scala, G. (1998). Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behav. Brain Res.* 91, 49–59. doi: 10.1016/s0166-4328(97)00102-2
- Wise, S. P., and Murray, E. A. (2000). Arbitrary associations between antecedents and actions. *Trends Neurosci.* 23, 271–276. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01570-8
- Yin, H. H., and Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 464–476. doi: 10.1038/nrn1919
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., and Balleine, B. W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur. J. Neurosci.* 19, 181–189. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03095.x
- Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J., and Balleine, B. W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 22, 513–523. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Busse and Schwarting. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Rainer Schwarting bedanken. Danke, dass Du mir die Gelegenheit gegeben hast dieses Projekt durchzuführen und Teil Deiner Arbeitsgruppe zu sein. Deine exzellente Betreuung und Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung des Projekts haben maßgeblich zur Erstellung der vorliegenden Arbeit beigetragen und Deine wertvollen Ratschläge haben mir immer geholfen den Fokus zu behalten.

Einen sehr großen Dank möchte ich an Janine Roscher aussprechen, die mir bei der Datenerhebung und Datenauswertung eine große Hilfe war. Dieser Dank gebührt ebenfalls Moritz Happel und Janosch Beer, die beide im Verlauf meiner Promotion einen signifikanten Beitrag für die Datenerhebung und Datenanalyse geleistet haben.

Ein großer Dank gebührt außerdem meinem Doktorandenvorgänger Dr. Moritz Thede Eckart sowie meinem Bürokollegen Dr. Dominik Seffer, die mich in der Anfangszeit meiner Promotion mit viel Unterstützung und Geduld in die verschiedenen Methoden und Paradigmen eingearbeitet haben.

Zusätzlich möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Verhaltensneurowissenschaft meinen Dank aussprechen: Die Promotionszeit hätte ohne euch niemals so angenehm verlaufen können! Vielen Dank für die interessanten Gespräche, die tolle Arbeitsatmosphäre und ganz allgemein die schöne Zeit; egal ob im Büro, im Labor oder im Quodlibet.

Ein besonderes Dankeschön an dieser Stelle auch an Alexander Engelhardt und erneut an Dr. Dominik Seffer für die finale Korrektur und Überarbeitung des Manuskripts.

Abschließend möchte ich ein riesengroßes Dankeschön an meine Familie, meine Freunde und an meine Freundin Ronja aussprechen. Für eure nicht endende emotionale Unterstützung, eure Geduld sowie eure aufmunternden und ermutigenden Worte und Taten möchte ich mich aus ganzem Herzen bedanken.

Publikationen - Individuelle Leistungen

Publikation 1:

Busse S, Schwarting RKW (2016) Performance benefits after dorsal hippocampal ablations in the rat sequential reaction time task. **Neurotoxicity Research** 29 (1): 54-68

Sebastian Busse 75%

Prof. Dr. Rainer Schwarting 25%

Publikation 2:

Busse S, Schwarting RKW (2016) Decoupling Actions from Consequences: Dorsal Hippocampal Lesions Facilitate Instrumental Performance, but Impair Behavioral Flexibility in Rats. **Frontiers In Behavioral Neuroscience** 10: 118

Sebastian Busse 75%

Prof. Dr. Rainer Schwarting 25%

Sebastian Busse gesamt: 150%

Ort/Datum

Sebastian Busse

Prof. Dr. Rainer Schwarting

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Sämtliche Stellen der Arbeit, die benutzten Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich durch Quellenangaben kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen sowie für Quellen aus dem Internet. Die Dissertation wurde weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Ort/Datum

Sebastian Busse